

VICTOR ALEXANDRE FERREIRA TARINI

**EFEITO DO EXERCÍCIO DE ULTRA
ENDURANCE SOBRE AS RESERVAS DE
GLICOGÊNIO INTRAMUSCULAR E A
EXPRESSÃO DA PROTEINA AMPK EM RATOS
TREINADOS**

**Tese apresentada a Universidade Federal de São Paulo,
para a obtenção do título de Doutor em Ciências**

ORIENTADOR: Prof. Dr. **FLÁVIO FALOPPA**

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. **RICARDO MÁRIO ARIDA**

São Paulo

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA PLÁSTICA**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Nelson Tarini (*in memorian*) e Maria de Fátima Gouveia Ferreira Tarini, **meus maiores incentivadores** e que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis.

À minha esposa Paula, **por todo amor, dedicação e sacrifício** em prol da minha tranquilidade para realizar este trabalho.

Às minhas filhas Amanda e Bianca, **por quem tudo vale a pena**. Por todos os momentos de descontração que me ajudaram a superar as dificuldades ao longo deste estudo.

Ao Prof. Dr. Beny Schmidt, **por acreditar em mim**, dando-me a oportunidade que a anos eu buscava.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por mais esta conquista.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Flávio Faloppa**, pela confiança e apoio ao longo deste estudo.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Ricardo Mário Arida**, exemplo de generosidade e desprendimento que procurarei seguir ao longo da minha vida.

Ao amigo **Prof. Dr. Acary Souza Bulle Oliveira**, pelo acolhimento no setor de doenças neuromusculares, dando-me oportunidade de ampliar meus conhecimentos, pelos ensinamentos e exemplo de conduta ética.

Ao amigo **Prof. Dr. Ricardo Zanuto Pereira**, pela amizade e por tudo o que fez e faz por mim até hoje.

Ao amigo **Prof. Dtdo. Paulo Roberto Correia**, por abrir portas.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP**, pelo patrocínio deste estudo.

À **Universidade Federal de São Paulo UNIFESP-EPM**, que por meio do programa de pós-graduação em ortopedia e traumatologia, permitiu a realização deste trabalho e, conseqüentemente, o meu aperfeiçoamento.

Ao **Prof. Dr. João Carlos Belotti**, pela atenção e encaminhamento no início deste trabalho, sem o qual não teria seguido adiante

À amiga **Roseli Paschoa**, Secretária do programa de pós-graduação em ortopedia e traumatologia da UNIFESP-EPM, por todo apoio ao longo do projeto.

À amiga **Roseli Martins de Castro**, secretária do Dr Beny, que sempre fez de tudo para me ajudar.

À amiga **Dinah Cesar Franco**, pelo incentivo dado a mim desde o vestibular.

Ao **Eduardo da Silva Alves**, pela ajuda com o treinamento dos animais.

Aos **colegas de laboratório (TODOS)**, que de uma maneira ou de outra propiciaram a mim momentos de aprendizagem.

Ao **Prof. Dr. Jean Jacques Bonvent**, pelos ensinamentos acerca da análise da densidade ótica.

Ao **Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza**, por permitir a realização da maioria dos experimentos no laboratório do departamento de neurofisiologia experimental, bem como utilizar todos os equipamentos sem qualquer restrição.

Ao amigo **Mauro Cardoso Pereira** pela companhia, ensinamentos, suporte e amizade dedicados a mim.

À **Profª. Drª. Carla Scorza**, pela contribuição e amizade.

Aos colegas **Daniel e Ricardo** da Psicobiologia, que compartilharam técnicas e procedimentos comigo nos últimos anos.

À amiga **Marilde**, que se disponibilizou diversas vezes para me acompanhar nos experimentos.

À amiga **Marlene**, experiente técnica do laboratório de biópsias do setor de doenças neuromusculares que me ensinou as técnicas de histoquímica.

A amiga **Yasmin**, pelo precioso tempo e apoio dedicados ao meu trabalho.

A amiga **Norma**, pelo precioso tempo e apoio dedicados ao meu trabalho.

Ao amigo **Roberto**, pelas dicas de fotografia.

Ao amigo **Prof. Dr. Leonardo Tavares Martins**, coordenador do Curso de Educação Física do Centro Universitário Adventista de São Paulo C1, por todo apoio nos momentos em precisei me ausentar da sala de aula para me dedicar a este projeto, pela amizade sincera e pelos ensinamentos ao longo do caminho.

Ao **Prof. Dr. Ibrahim El Hayek**, pelo apoio, compreensão, amizade e incentivo ao longo deste período.

Ao amigo **Prof. Dr. Waldecir de Paula Lima**, pela amizade e conselhos preciosos.

Ao amigo **Prof. Dr. Luis Carlos Carnevali Jr.** Pela amizade e disposição a ajudar nos momentos difíceis que passei durante este trabalho.

À **Profª. Drª. Marilia Seeleander**, Pelo apoio técnico na reta final, colocando seu laboratório a minha disposição.

Ao amigo **Prof. Dtdo. Mário Filho**, pela colaboração, amizade e solidariedade no final deste trabalho.



*“A expressão
vocabular humana
não sabe ainda
e provavelmente
não o saberá nunca,
conhecer, reconhecer
e comunicar
tudo quanto é
humanamente
experimentável
e sensível.”*

José Saramago

“A caverna” /José Saramago.- São Paulo: Companhia das Letras, 2000.” pg 303.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	III
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS	IV
AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE TABELAS	XI
LISTA DE GRÁFICOS.....	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMO	XVIII
INTRODUÇÃO.....	2
CAPTAÇÃO DE GLICOSE INDUZIDA PELA INSULINA.....	4
CAPTAÇÃO DE GLICOSE INDUZIDA PELA CONTRAÇÃO MUSCULAR.....	8
FIBRAS MUSCULARES	12
OBJETIVOS.....	15
OBJETIVO GERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
MÉTODO	18
INSUMOS	18
SOLUÇÕES UTILIZADAS NA HISTOLOGIA:	19
SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE BIOQUÍMICA DO GLICOGÊNIO:....	19
SOLUÇÕES UTILIZADAS NO IMUNOBLOTTING:	20
ANIMAIS:.....	23
FAMILIARIZAÇÃO AO ERGÔMETRO	24
TESTE DE VELOCIDADE MÁXIMA.....	26
PROTOCOLO DE TREINAMENTO.....	26
TESTE DE ULTRA ENDURANCE.....	27
RETIRADA DOS MÚSCULOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	27
IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA MIOSINA DE CADEIA PESADA LENTA (MHCS)	29
HISTOQUÍMICA:.....	30
DIGESTÃO DO GLICOGÊNIO COM α -AMILASE E TRATAMENTO COM PAS:	31
PAS.....	31

BATERIA DE MONTAGEM DAS LÂMINAS.....	31
DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA	32
QUANTIFICAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR POR MÉTODO COLORIMÉTRICO:.....	33
SOLUÇÃO ANTRONA.....	34
CURVA PADRÃO DO GLICOGÊNIO	34
CURVA DE GLICOGÊNIO	34
EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS E IMMUNOBLOTTING	35
TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT- PCR)	36
DETERMINAÇÃO DA INSULINA PLASMÁTICA POR RADIOIMUNOENSAIO:	39
DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO.	40
DETERMINAÇÃO DA CITRATO SINTASE POR ENSAIO ENZIMÁTICO	41
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
RESULTADOS	45
MASSA CORPORAL	45
TEMPO DE TESTE	45
VELOCIDADE	46
TRABALHO TOTAL	46
GLICOGÊNIO INTRAMUSCULAR	47
GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	47
GLICOSE E INSULINA PLASMÁTICA	48
CITRATO SINTASE	49
HISTOQUÍMICA.....	49
IMUNOISTOQUÍMICA	50
DENSIDADE ÓTICA	53
EXPRESSÃO PROTÉICA (AMPK)	57
EXPRESSÃO PROTÉICA (mTOR).....	58
EXPRESSÃO DE RNA mensageiro (AMPK).....	59
EXPRESSÃO DE RNA mensageiro (mTOR)	59
DISCUSSÃO	61
ANÁLISE BIOQUÍMICA DO GLICOGÊNIO INTRAMUSCULAR.....	62
ANÁLISE DA DENSIDADE ÓTICA	63
ADAPTAÇÕES INDUZIDAS PELO TREINAMENTO	66
AMPK	68

mTOR.....	72
LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS	75
FUTURAS INVESTIGAÇÕES	77
CONCLUSÕES	79
ANEXOS	81
ANEXO 1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL	81
ANEXO 2. ARTIGOS EM FASE FINAL DE ELABORAÇÃO PARA SEREM SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO:	82
ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO AO LONGO DO ESTUDO.	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ABSTRACT	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Sequência dos primers para RT-PCR.....	35
Tabela 2. Comparação dos níveis de glicose plasmática (mg/dl) dos níveis de insulina plasmática (ng/ml) entre grupos	43
Tabela 3. Valores de atividade enzimática da enzima citrato sintase.....	43
Tabela 4. Valores de densidade ótica por tipo de fibra muscular.....	47
Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão múltipla.....	49
Tabela 6. Coeficientes obtidos pela regressão múltipla.....	49
Tabela 7. Valores obtidos a partir da regressão múltipla. Análise dos segmentos proximal, medial e distal da densidade ótica do músculo gastrocnêmio.....	50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 Peso corporal ao final do estudo.....	40
GRÁFICO 2 Tempo decorrido em minutos ao atingir a exaustão em teste de ultra endurance.....	40
GRÁFICO 3 Velocidade em metros por minuto empregada durante o teste de ultra endurance até a exaustão.....	41
GRÁFICO 4 Trabalho total em quilogramas por metro por minuto (kgm) obtido durante o teste de ultra endurance.....	41
GRÁFICO 5 Glicogênio muscular expresso em miligramas por cem miligramas de proteína medido por método colorimétrico.....	42
GRÁFICO 6 Glicogênio hepático expresso em miligramas por cem miligramas de proteína medido por método colorimétrico.....	42
GRÁFICO 7 Regressão múltipla produzida a partir das médias dos valores individuais de densidade ótica das fibras musculares (porções proximal, medial e distal) coradas histoquimicamente com PAS e o glicogênio muscular medido bioquimicamente.....	48
GRÁFICO 9 Análise comparativa dos valores de glicogênio muscular obtidos bioquimicamente e dos valores obtidos pela regressão múltipla.....	51
GRÁFICO 9 Expressão protéica da proteína AMPK subunidade alfa 1.....	51
GRÁFICO 10 Expressão protéica da proteína AMPK subunidade alfa 2.....	51
GRÁFICO 11 Expressão protéica da proteína mTOR.....	52
GRÁFICO 12 Expressão de RNA mensageiro da subunidade alfa 1 da proteína AMPK.....	53
GRÁFICO 13 Expressão de RNA mensageiro da subunidade alfa 2 da proteína AMPK.....	53
GRÁFICO 14 Expressão de RNA mensageiro da proteína mTOR.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Etapas iniciais da ação do hormônio insulina.....	6
FIGURA 2. Diagrama esquemático dos fatores que regulam a atividade da proteína AMPK.....	10
FIGURA 3. Fluxograma de treinamento.....	22
FIGURA 4. Diagrama exemplificando a fixação do músculo gastrocnêmio a uma placa de poliestireno.....	24
FIGURA 5. Cortes histológicos corados histoquimicamente para ATPase, amilase e PAS.....	45
FIGURA 6. Cortes histológicos corados imunoistoquimicamente para Miosina de Cadeia Pesada do tipo I e histoquimicamente para amilase e PAS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l:	Microlitro
μ m:	Micron
1M:	1 mol
ADP:	Di-fosfato de adenosina
AGC:	Proteína serina/treonina quinase
AICAR:	<i>Amminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide</i>
AKT:	Proteína kinase B
AMPC:	Monofosfato de adenosina quinase cíclico
AMPK:	Monofosfato de adenosina quinase
Anti-AMPK α 1 e 2:	Anticorpo anti- monofosfato de adenosina quinase alfa 1 e alfa
ATP:	Trifosfato de adenosina
ATPase:	Tri-fosfato de adenosina quinase
C3G:	Proteína trocadora de nucleotídeos
CaMK:	Ca ²⁺ Calmodulina quinase
CAP:	Proteína adaptadora
Cbl:	Proto onco gene
CBS:	Cistationa β -sintase
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEEA:	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEP:	Comitê de ética em Pesquisa
COBEA:	Colégio brasileiro de experimentação animal
Crk2:	Proto onco gene
DAB:	3,3- Diaminobenzidina
DAG:	Diacilglicerol
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DHEA:	Diidroepiandroterona
dNTP:	Desoxirribonucleico trifosfatado
DTT :	Aprotinina, ditiotreitól
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FRAP:	domínio de ligação com mTOR.
G:	Gramma

GBD:	<i>Glycogen binding domain</i>
GDP:	Guanidina di-fosfato
GLUT:	<i>Glucose transporter</i> - transportador de glicose
GSK3:	Glicogênio sintase quinase 3
GTP:	Guanidina tri-fosfato
GTPase:	Guanidina trifosfatase
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄ :	Ácido sulfúrico
HCL:	Ácido clorídrico
IRS:	<i>Insuline receptor substrate</i> - substrato do receptor de insulina
KCl:	Cloreto de potássio
kDa:	Quilodalton
KH ₂ PO ₄ :	Di-fosfato Potássio
<i>K_m</i> :	Constante de afinidade enzimática
KOH:	Hidróxido de Potássio
LBK1:	STK11 serina treonina quinase 11
m/min:	Metro por minuto
mg/dl:	Miligrama por decilitro
MgCl ₂ :	Cloro de magnésio
MHCs:	<i>Myosin Heavy Chain Slow</i> - Miosina de cadeia pesada lenta
ml:	Mililitro
mM:	Milimol
Mo25:	Mouse protein 25
mTOR:	<i>Mammalian targe of rapamicin</i>
<i>n</i> :	Número de amostra
Na ⁺ :	Sódio
Na ₂ HPO ₄ :	Di-sódio fosfato
NaCl:	Cloreto de sódio
ng:	Nanogramas
nm:	Nanômetro
°C:	Graus Celsius
PAS:	Ácido Periódico de Schiff

PBS:	<i>Phosphate buffered Saline</i> - Tampão fosfato salina
PDK-1:	Fosfoinosidido dependente quinase-1
pH:	Potencial hidrogeniônico
Pi:	Fosfato inorgânico
Pi3K:	Fosfatidil inositol 3 quinase.
PKB:	Proteína kinase B
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoreto
PMSF:	Fenilmetilsulfonilfluoreto
PP2C:	Proteína fosfatase 2 C
Rho:	Molécula sinalizadora
RIE:	Radioimunoensaio
RNA:	Ácido ribonucléico
RNase:	Ribonuclease
rpm:	Rotações por minuto
RT-PCR:	Transcriptase reversa reação em cadeia polimerase
S:	Sedentário
SDS:	Sódio dodecil
SDS-PAGE:	Sódio dodecil Sulfato de poliacrilamida
SE:	Sedentário Exaustão
Sh2:	Domínio Sh2
Src2:	Homólogo de Sh2
STRAD:	Pseudo-quinase <i>STRelated-adaptor</i>
T:	Treinado
TAK1:	<i>Transforming growth factor-activated kinase</i>
Taq DNA:	DNA polimerase termoestável
TC10:	Proteína
TE	Treinado exaustão
TEC:	Tirosina quinase
Thr 172:	Treonina 172
TRIS:	Metano-hidroximetilamina
UV:	Ultra-violeta

$V_{m\acute{a}x}$: Quando se referir a atividade enzimática, Velocidade máxima de ativação

$V_{m\acute{a}x}$: Quando se referir a teste de velocidade, velocidade máxima observada em teste

$V\text{O}_2\text{M\acute{a}ximo}$: Consumo máximo de oxigênio

α : Letra grega: alfa

β : Letra grega: beta

γ : letra grega gamma

RESUMO

Durante o exercício dinâmico, as demandas de trifosfato de adenosina (ATP) aumentam significativamente e a sua reposição ocorre pelo catabolismo do glicogênio e ácidos graxos. Os efeitos do exercício sobre as reservas de glicogênio intramuscular já foram amplamente estudados. Porém, não se tem conhecimento sobre os efeitos do exercício de ultra endurance sobre o seu metabolismo. Nas últimas décadas a proteína AMPK tem sido descrita como um sensor das variações nas reservas de energia, sendo diretamente afetada pela contração muscular. O objetivo do presente estudo foi de verificar os efeitos do exercício de ultra endurance sobre as reservas de glicogênio muscular (GM) e a expressão da proteína AMPK. Métodos: vinte e quatro ratos wistar, machos, foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (sedentário S=6, sedentário exaustão SE=6, treinado T=6 e treinado exaustão TE=6), onde T e TE correram progressivamente numa esteira rolante por 1,5 h/dia, 5d/semana durante 12 semanas (60% da V_{máx}). Ao final SE e TE foram submetidos a um exercício de ultra endurance (60% de V_{máx}) até a exaustão. O gastrocnêmio de ambas as patas foram retirados para análise do glicogênio por método colorimétrico e pela densidade ótica. A expressão gênica e protéica foi determinada por RT-PCR *real time* e por *western blotting* respectivamente. Resultados: Os grupos SE e TE apresentaram depleção significativa das reservas de GM (S = $0,213 \pm 0,003$; T = $0,203 \pm 0,007$; SE = $0,031 \pm 0,006$; TE = $0,028 \pm 0,006$ mg/g proteína) ($p < 0,001$). O glicogênio hepático apresentou diferença significativa nos grupos T e TE (S = $1,157 \pm 0,09$, SE = $1,002 \pm 0,05$, T = $1,533 \pm 0,05$ e TE = $1,037 \pm 0,05$) ($p < 0,05$). O grupo TE apresentou diminuição significativa na glicemia (S = $90,43 \pm 2,47$, SE = $85,75 \pm 3,18$, T = $84,84 \pm 2,19$ e TE = $76,02 \pm 5,60$) ($p < 0,05$). A expressão protéica da AMPK aumentou em T e TE ($p < 0,05$). Porém, a expressão gênica aumentou somente em TE ($p < 0,05$). Conclusão: O exercício de ultra endurance depletou as reserva de GM predominantemente nas fibras musculares do tipo I. O treinamento de forma isolada afetou positivamente a expressão protéica da AMPK. Sendo mais evidente quando somado o fator exaustão.

Palavras-chave: Glicogênio, AMP, exercício exaustivo e resistência física.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do glicogênio por Claude Bernard em 1855, vários estudos foram realizados com o intuito de desvendar os muitos aspectos do seu metabolismo. Alguns estudos foram direcionados a quantificação e localização das reservas de glicogênio (Roach, Cheng *et al.*, 1998; Marchand, Chorneyko *et al.*, 2002) enquanto outros se dedicaram a compreender de que forma as células regulam seus estoques (Jeukendrup, Mensink *et al.*, 1997; Roach, Cheng *et al.*, 1998; Fujii, N., Aschenbach, W. G. *et al.*, 2004; Shearer e Graham, 2004). Contudo, ainda existem questões acerca do seu pleno funcionamento que permanecem sem resposta.

Os estoques de glicogênio intramuscular desempenham um papel vital na sustentação das demandas metabólicas do músculo esquelético ao longo da atividade física (Fairchild e Fournier, 2004). Durante o exercício dinâmico, as demandas de trifosfato de adenosina (ATP) aumentam significativamente e a sua reposição se dá pelo catabolismo dos carboidratos (glicogênio intramuscular e glicose sanguínea) e ácidos graxos (triglicerídeos intramusculares e lipídios sanguíneos) (Frayn, 2003). Embora a velocidade de quebra do glicogênio muscular varie conforme a intensidade de esforço físico, a depleção de seus estoques é evidenciada à medida que o exercício físico se prolonga (Fairchild, Armstrong *et al.*, 2003). Tão logo os níveis de glicogênio muscular sofram diminuição, mecanismos compensatórios têm sido propostos no sentido de aumentar a captação de glicose plasmática pelo músculo, a fim de sustentar as demandas de ATP evitando a exaustão (Rose e Richter, 2005).

Basicamente, existem três sítios que regulam a captação de glicose pelas células musculares “*in vivo*”: o plasma, mantendo a oferta de glicose para as células do músculo esquelético; a membrana celular por meio da sua

permeabilidade para glicose (transporte de glicose); e o fluxo do metabolismo (atividade da enzima hexoquinase) (Rose e Richter, 2005).

O primeiro mecanismo a ser citado, corresponde a um aumento exponencial da oferta de glicose plasmática para os músculos ativos durante o exercício físico. Isto ocorre devido ao aumento do fluxo sanguíneo para os músculos ativos em resposta a um aumento do tônus simpático. Este volume pode chegar a vinte vezes os valores de repouso (Andersen e Saltin, 1985; Clifford e Hellsten, 2004). O aumento da perfusão sanguínea nos músculos ativos parece também representar alguma importância sobre oferta de glicose plasmática para as células musculares em atividade (Richter, E. A., Wojtaszewski, J. F. *et al.*, 2001).

Alguns estudos mencionaram que o aumento da oferta de glicose para os músculos em exercício propiciou um aumento da captação de glicose por parte das células musculares ativas tanto “*in vitro*” (Nesher, Karl *et al.*, 1985; Ploug, Galbo *et al.*, 1987; Ploug, Galbo *et al.*, 1992) quanto “*in vivo*” (Zinker, Lacy *et al.*, 1993; Richter, E. A., Wojtaszewski, J. F. *et al.*, 2001), apesar das condições controladas, onde a concentração plasmática de insulina foi mantida em nível basal. Em uma situação oposta, foi observada uma diminuição da captação de glicose pelas células musculares ativas à medida que as concentrações plasmáticas de glicose sofreram redução durante um exercício prolongado (Ahlborg, Felig *et al.*, 1974). Portanto, parece haver uma relação linear entre as concentrações plasmáticas de glicose e a sua captação pelo músculo durante o exercício.

Estando bem estabelecidas as variáveis que podem interferir na oferta de glicose para as células musculares, convém observar de que forma a membrana celular regula a sua captação durante o exercício.

O músculo esquelético expressa algumas isoformas de transportadores de glicose (GLUT -1, 4 e 5), das quais a mais abundante é a isoforma “4” (Gould e Holman, 1993). Diferente das demais isoformas que, por constituição residem na superfície da membrana celular, o GLUT-4 se deposita no interior da célula e a sua ativação é mediada pelo hormônio insulina e ou pela contração muscular (Pascoe, Inukai *et al.*, 1996; Zisman, Peroni *et al.*, 2000).

CAPTAÇÃO DE GLICOSE INDUZIDA PELA INSULINA

Basicamente, o hormônio insulina e a contração muscular recrutam transportadores GLUT-4 provenientes de diferentes sítios intracelulares (Ploug, Van Deurs *et al.*, 1998). Porém, os efeitos produzidos sobre a cinética enzimática parecem ser similares (Hansen, Gulve *et al.*, 1995). De acordo com a cinética de *Michaelis-Menten* (Michaelis e Menten, 1913) e outros estudos (King, P. A., Hirshman, M. F. *et al.*, 1989; Sternlicht, E., Barnard, R. J. *et al.*, 1989; Zinker, Lacy *et al.*, 1993), a contração muscular bem como a insulina aumenta a (V_{max}) do transporte de glicose no músculo esquelético sem afetar a constante de afinidade (K_m). Isto sugere que, tanto o exercício quanto a insulina promovem um aumento no número de transportadores de glicose na membrana sem afetar a afinidade da glicose ao GLUT-4.

Os mecanismos que promovem a translocação do GLUT-4 para a superfície da membrana envolvem a ativação de uma série de proteínas e o principal mecanismo é conhecido como via de sinalização de insulina (Chang, Chiang *et al.*, 2004).

A insulina é um hormônio anabólico que atua na manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular. Esse

hormônio é secretado pelas células β das ilhotas de Langerhans no pâncreas em resposta ao aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos após as refeições. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos e reduz a lipólise, bem como aumenta a síntese e inibe a degradação protéica (Carvalheira, Zecchin *et al.*, 2002).

A ação da insulina, ao nível celular (figura 1), inicia-se através da sua união ao seu receptor de membrana citoplasmática (Freychet, Roth *et al.*, 1971; Cuatrecasas, 1972; Kahn, 1985). Este receptor está presente em praticamente todos os tecidos dos mamíferos, mas suas quantidades variam desde 40 receptores nos eritrócitos circulantes até mais de 200.000 receptores nas células adiposas e hepáticas. O receptor de insulina é uma glicoproteína heterotetramérica constituída por duas subunidades α , cada uma com 135 kDa e duas subunidades β , cada uma com 95 kDa, unidas por ligações dissulfeto (Khan, 1985). A subunidade α é inteiramente extracelular e contém o sítio de ligação da insulina. A subunidade β é uma proteína transmembrana responsável pela transmissão do sinal. A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade do receptor (Patti e Kahn, 1998).

Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. Atualmente, dez substratos do receptor de insulina (*insulin receptor substrate – IRS*) já foram identificados. Quatro desses pertencem à família dos substratos do receptor de insulina, as proteínas IRS (White, 1998). A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase) (Chang, Chiang *et al.*, 2004).

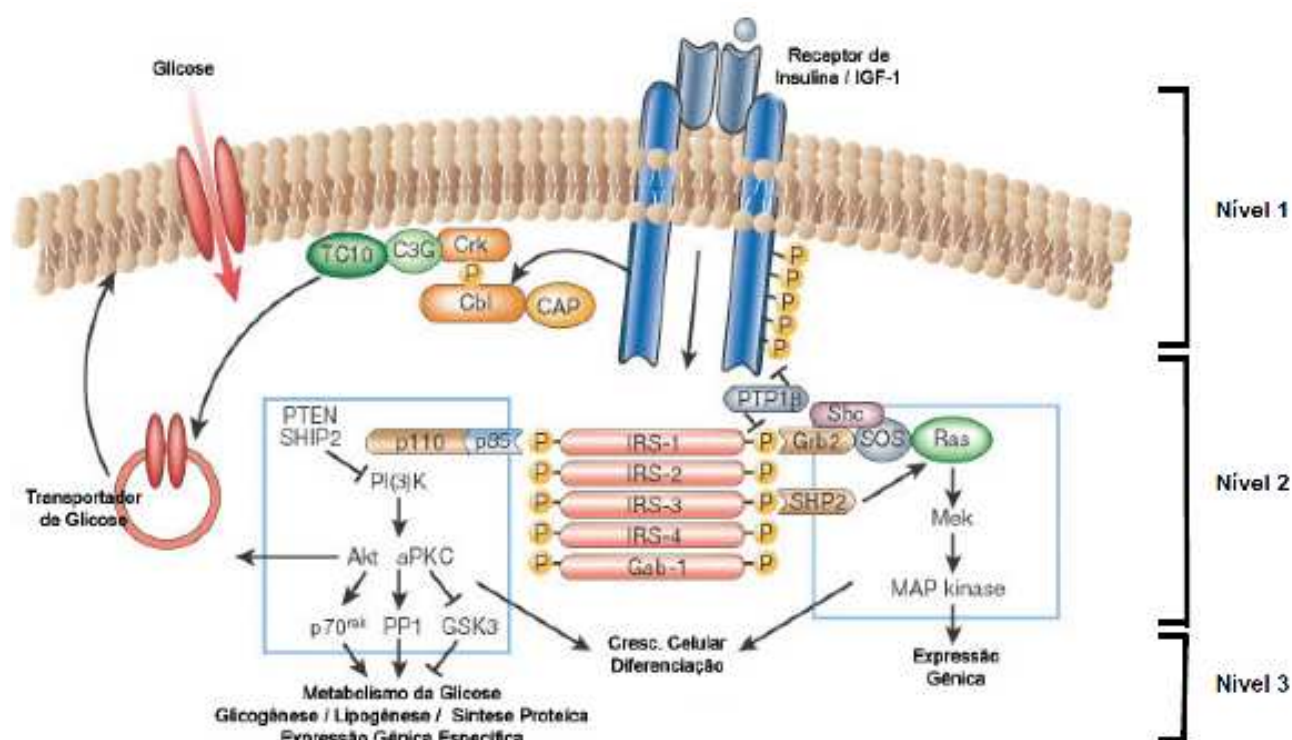


Figura 1 *Etapas iniciais da ação do hormônio insulina. Representação da ação insulínica dividido em três níveis. Nível 1: acoplamento da insulina ao receptor na membrana celular. Nível 2: representação dos fenômenos bioquímicos relacionados à atividade tirosina-quinase do receptor de insulina. Nível 3: efeitos biológicos finais (Saltiel e Kahn, 2001).*

A PI 3-quinase cumpre um papel importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina (Folli, Saad *et al.*, 1992; Saad, Araki *et al.*, 1992; Saad, Folli *et al.*, 1993; Shepherd, Nave *et al.*, 1995). Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose (Czech e Corvera, 1999). A sua atividade regula três classes principais de moléculas sinalizadoras: família das proteínas serina/treonina quinases AGC, família das GTPases Rho e a família de tirosinas quinases TEC. A PI 3-quinase também ativa a via mTOR/FRAP e pode estar envolvida na regulação da fosfolipase D, resultando em hidrólise de fosfatidilcolina e aumento de ácido fosfatídico e diacilglicerol (DAG) (Saad, Folli *et al.*, 1993).

A proteína mais bem caracterizada das quinases AGC é a PDK-1, quinase dependente de fosfoinositol-1, que ativa a serina/treonina quinase AKT, também conhecida como PKB. A AKT tem sido sugerida como uma importante proteína na transmissão do sinal insulínico, através da fosforilação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3), de fatores de transcrição denominados *forkhead* e da proteína ligadora do elemento responsivo ao AMP cíclico (AMPC) (Nakae e Accili, 1999).

Além da ativação da PI 3-quinase, outras formas de sinalização são necessárias para que a insulina estimule o transporte de glicose (Pessin e Saltiel, 2000). Uma segunda via envolve a fosforilação do protooncogene Cbl (Ribon e Saltiel, 1997). Na maioria dos tecidos sensíveis à insulina, Cbl está associado com a proteína adaptadora CAP (Ribon, Herrera *et al.*, 1998). Após a fosforilação do complexo, Cbl-CAP migra para a membrana celular e interage com a proteína CrkII, que também está constitutivamente associada

com a proteína C3G (Baumann, Ribon *et al.*, 2000; Chiang, Baumann *et al.*, 2001). A C3G é uma proteína trocadora de nucleotídeos que catalisa a troca de GDP em GTP da proteína TC10 ativando-a. Uma vez ativada, a TC10 causa um segundo sinal para a translocação do GLUT4, em paralelo à ativação da via PI 3-quinase (Chiang, Baumann *et al.*, 2001) (ver figura 1).

CAPTAÇÃO DE GLICOSE INDUZIDA PELA CONTRAÇÃO MUSCULAR

Enquanto o exercício agudo aumenta a translocação do GLUT-4 para a membrana plasmática, o exercício crônico, particularmente o de endurance, aumenta a quantidade total disponível de transportadores GLUT-4 (Stoppani, Hildebrandt *et al.*, 2002). No entanto, as vesículas de GLUT4 ativadas pela contração muscular se diferem daquelas ativadas pela sinalização da insulina (Douen, Ramlal *et al.*, 1990; Coderre, Kandrór *et al.*, 1995; Ploug, Van Deurs *et al.*, 1998; Lemieux, Han *et al.*, 2000). O aumento na captação de glicose e as maiores concentrações de GLUT4 na membrana durante o exercício ocorrem a partir de sinais moleculares distintos daqueles originados pelo hormônio insulina (Lee, Hansen *et al.*, 1995; Lund, Holman *et al.*, 1995; Ihlemann, Galbo *et al.*, 1999; Wright, Hucker *et al.*, 2004).

Durante o exercício físico, os níveis plasmáticos de insulina não sofrem elevação. No entanto, a captação de glicose se eleva significativamente nos músculos ativos e este fenômeno tem sido atribuído à proteína AMPK (Stoppani, Hildebrandt *et al.*, 2002; Fujii, N., Aschenbach, W. *et al.*, 2004). O acúmulo de ADP e Pi, decorrente da contração muscular durante o exercício, ativa uma proteína serina/treonina quinase conhecida como AMPK (Corton, Gillespie *et al.*, 1994). Esta proteína tem sido descrita como a principal responsável na ativação da captação de glicose durante o exercício. A

eterotrimérica proteína AMPK possui três sub-unidades: uma sub-unidade catalítica (α) e outras duas sub-unidades regulatórias, (β e γ) (Jorgensen e Rose, 2008). Cada uma destas sub-unidades desempenha um papel específico na estabilidade e atividade da AMPK. A sensibilidade da AMPK às alterações na razão AMP/ATP é justificada pela presença de quatro domínios cistationina β -sintase (CBS). Estes quatro domínios formam dois sítios de ligação para o AMP, conhecidos como “Domínios Bateman”, o que demonstra que a proteína AMPK é alostericamente ativada neste sítio (Adams, Chen *et al.*, 2004).

Durante a contração muscular, moléculas de ATP são hidrolizadas formando ADP. À medida que o exercício se prolonga e ou a intensidade aumenta, nota-se que a ressíntese de ATP passa a depender também da reação produzida pela enzima *adenilato quinase* ($ADP + ADP = ATP + AMP$), elevando assim a razão AMP/ATP (Corton, Gillespie *et al.*, 1994).

Com a ligação do primeiro AMP no domínio bateman, ocorre uma facilitação para que o segundo AMP se ligue ao outro domínio, alterando a conformação da sub-unidade “ γ ”, aumentando a afinidade de uma proteína chamada LBK1 e diminuindo a afinidade de outra proteína a fosfatase PP2C, esta última parece exercer uma atividade regulatória sobre a proteína Treonina 172 (Thr-172), uma vez que a ligação do AMP na AMPK produz um substrato pior para a fosfatase PP2C, diminuindo então a atividade fosfatase para a Thr-172 preservando-a fosforilada (Jorgensen e Rose, 2008).

O fenômeno decorrente deste processo é a exposição do domínio catalítico da sub-unidade “ α ”. Uma vez exposto, este sofre influência Thr-172. A atividade da proteína AMPK pode ser covalentemente aumentada pela fosforilação reversível sobre a sub-unidade “ α ” da Thr-172. Esta proteína sofre influência direta de uma enzima a AMPK quinase (AMPKK), também

sensível às variações nas concentrações de AMP. O complexo formado pela (LBK1), *Mouse protein 25* (Mo25) e a pseudo quinase “*STE-related adaptor protein*” (STRAD), foi identificado como a principal via de fosforilação da AMPK através da Thr-172 (Lee, Kim *et al.*, 2006). Além deste complexo, outros autores descreveram a fosforilação da Thr-172 por parte da Ca^{2+} /calmodulina sensível CaMK quinase devido ao aumento no fluxo de íons Ca^{2+} durante a contração muscular (Hawley, Davison *et al.*, 1996) (figura 01).

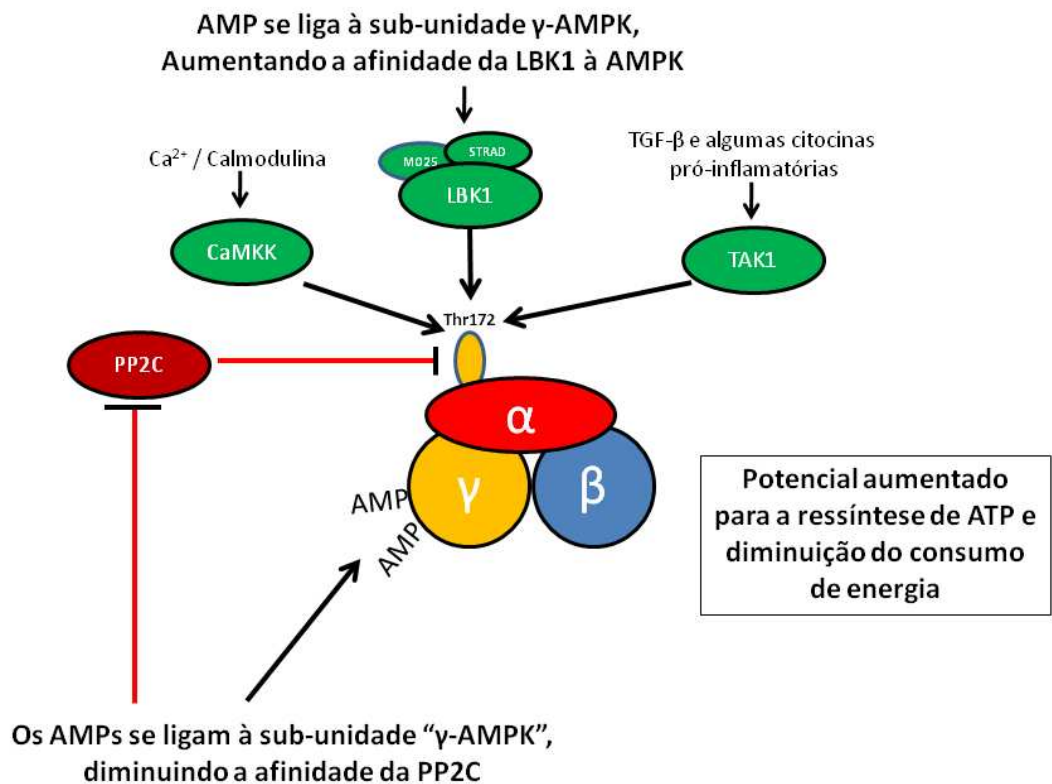


Figura 2 Diagrama esquemático dos fatores que regulam a atividade da AMPK. A ligação de AMPs livres nos domínios bateman localizados na sub-unidade “ γ ” induz a uma mudança conformacional na holoenzima AMPK, que aumenta alostericamente, bem como covalentemente, por afetar a

*afinidade da fosfatase PP2C e possivelmente também a LKB1 em direção da Thr-172. A ligação do AMP ao AMPK o torna um substrato pior para a PP2C, diminuindo a atividade fosfatase em direção da Thr-172, possibilitando a ativação da AMPK por conservar a fosforilação da Thr-172. A atividade da LKB1 não parece ser regulada covalente ou alostericamente no músculo esquelético, porém, algumas observações sugerem que a afinidade da LKB1 à Thr-172 aumenta com o AMP. Muitas observações “in vitro”, bem como em cultura de células têm mostrado que a Ca^{2+} /calmodulina proteína quinase ativada CAMKK é uma AMPK quinase adicional na ativação da AMPK através da sinalização produzida pelo aumento no fluxo de Ca^{2+} durante a contração muscular. Finalmente, recentes evidências adicionaram o fator de transformação do crescimento quinase ativada “transforming growth factor-activated kinase (TAK1) à lista das AMPK quinases. Porém, o conhecimento à cerca do seu papel na ativação da AMPK ainda é limitado. Adaptado de Sebastian Beck Jorgensen e Adam J. Rose *Frontiers in bioscience*. 13,5589 – 5604, may 1, 2008.*

A subunidade β possui um sítio de ligação para moléculas de glicogênio conhecido como “domínio de ligação ao glicogênio” (*glycogen binding domain GBD*), onde o glicogênio exerce um papel inibitório da atividade da AMPK (Mcbride, Ghilagaber *et al.*, 2009).

Estudos têm demonstrado que contrações musculares induzidas por estímulo elétrico em músculo de ratos aumentam a ativação da AMPK, translocação do GLUT-4 e captação de glicose. O mesmo tem sido observado em estudos que utilizaram a infusão de (AICAR) *Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide*, um agonista da AMPK, o que estabelece a

relação entre o transporte de glicose para o músculo induzido pelo exercício à ativação da AMPK (Cheung, Salt *et al.*, 2000; Winder, 2001; Lee, Kim *et al.*, 2006; Winder e Thomson, 2007).

O tipo de exercício também influencia na forma com a qual a AMPK é ativada. Exercícios de alta intensidade e curta duração em roedores ativaram a sub-unidade $\alpha 1$, enquanto que exercícios de intensidade moderada e longa duração ativaram a sub-unidade $\alpha 2$ (Musi, Hayashi *et al.*, 2001; Park, Kaushik *et al.*, 2002). Esta diferença parece estar relacionada não só à relação volume/intensidade do exercício, mas também ao padrão de recrutamento das fibras musculares bem como ao tipo de músculo envolvido (Durante, Mustard *et al.*, 2002).

FIBRAS MUSCULARES

As fibras musculares se diferem predominantemente pela cor, bem como pela velocidade de contração. Fibras brancas são as de contração rápida, com metabolismo energético predominantemente glicolítico (*tipo IIb*). Fibras vermelhas podem também apresentar velocidade de contração rápida, com metabolismo energético misto entre oxidativo e glicolítico (*tipo IIa*), ou velocidade de contração lenta, com metabolismo energético predominantemente oxidativo (*tipo I*). A cor vermelha se deve à presença de uma proteína responsável pelo confinamento do O_2 no interior da célula: a *mioglobina*, além das enzimas que participam do metabolismo oxidativo (Pette e Staron, 1990).

A velocidade de contração muscular se deve à atividade da enzima *miosina ATPase* (Bárány, 1967).

Histoquimicamente é possível identificar os três tipos. A miosina ATPase reage com as soluções em diferentes valores de pH, o que possibilita a

distinção dos tipos de fibras musculares. Hoje, já se sabe que o número de isoformas desta enzima não se resume a três e sim sete subtipos (*I, Ic, IIc, IIac, IIa, IIab, IIb*). Contudo, observam-se com maior frequência os subtipos (*I, IIc, IIa e IIb*) (Staron e Hikida, 1992).

As fibras musculares possuem uma alta capacidade de adaptação às solicitações mecânicas como o exercício. Embora não seja possível notar qualquer alteração morfofuncional pelo método histoquímico, a eletroforese em gel possibilita constatar as alterações na expressão gênica das proteínas miofibrilares a partir de apenas duas semanas de treinamento com pesos. Especificamente na expressão das isoformas da miosina de cadeia pesada (MHC) (Staron, Karapondo *et al.*, 1994).

Embora já existam trabalhos descritos na literatura que observaram o comportamento do metabolismo muscular no exercício de ultra endurance, não há qualquer descrição do comportamento das reservas de glicogênio, nem tampouco das proteínas que sinalizam a sua captação durante o exercício.

As consequências da prática de exercícios de ultra endurance como a corrida de maratona, o triatlo, travessias a nado, corrida de aventura e tours com bicicleta ainda não foram suficientemente estudadas. A princípio, conhecer as respostas metabólicas bem como os ajustes celulares e moleculares em função do treinamento, do exercício extremamente prolongado e da exaustão, podem nos revelar novas evidências desta prática.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem por objetivo verificar o efeito do exercício ultra prolongado (ultra endurance) sobre as reservas de glicogênio intramuscular, bem como sobre a expressão protéica e gênica da proteína AMPK tanto por meio de estímulo agudo (uma única sessão) quanto cronicamente (após doze semanas de treinamento).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se o exercício de ultra endurance depleta os estoques de glicogênio intramuscular quando realizado sem qualquer reposição calórica durante o exercício.

Estimar o glicogênio remanescente por meio da análise histoquímica e densidade ótica.

Quantificar o glicogênio intramuscular por meio da análise bioquímica.

Estabelecer o coeficiente de correlação entre as duas medidas anteriores.

Estimar o glicogênio remanescente por tipo de fibra muscular por meio da equação de regressão.

Determinar o efeito do treinamento e do exercício de ultra endurance até a exaustão sobre a expressão protéica das subunidades catalíticas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) da proteína AMPK por meio da técnica de *immunoblotting*.

Determinar o efeito do treinamento e do exercício de ultra endurance até a exaustão sobre a expressão gênica das subunidades catalíticas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) da proteína AMPK por meio da técnica *RT-PCR realtime*.

MÉTODO

INSUMOS

Para a elaboração do reagente histoquímico ácido periódico de Schiff (PAS) foram necessárias as seguintes substâncias: Afuccina básica, carvão ativado, metabissulfito de Na^+ e ácido periódico, que foram fornecidas pelo laboratório Merck.

Para o congelamento das amostras foi utilizado isopentano refrigerado em nitrogênio líquido.

Os cortes gelados foram realizados em um criostato Leica mod. CM 1900.

Para a determinação da densidade ótica dos cortes corados histoquimicamente, foi utilizado um microscópio ótico trinocular modelo 50i da empresa Nikon (Japão). A imagem dos cortes foi capturada pelo computador por meio de uma câmera digital modelo DSFLi U2 da empresa Nikon (Japão).

A quantificação do glicogênio intramuscular obtido por método colorimétrico foi realizada em um espectrofotômetro UV visível modelo UV-1800 da empresa Shimadzu (Japão).

Foram utilizados os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) da empresa *Bio-Rad* (Richmond, Ca).

O Metano-hidroximetilamina (TRIS), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e aprotinina, ditioneitol (DTT), foram fornecidos pela *Sigma Chemical Co.* (ST. Louis, Mo). A proteína A-Sepharose 6MB foi fornecida pela *Pharmacia* (Uppsala, Suécia). A membrana de nitrocelulose (0,45 μm) foi fornecida pela *Bio-Rad* (Richmond, Ca). O anticorpo monoclonal anti-AMPK α^1 e 2 foi

importado da *Santa Cruz biotechnology, INC*. O kit de revelação por quimioluminescência empregado neste estudo foi fornecido pela empresa *Amersham Pharmacia Biotech* (UK, Buckinghamshire, England). O reagente Bradford para leitura de proteínas totais foi adquirido da empresa *Bio-Rad* (Richmond, Ca). Os kits comerciais para determinação de insulina por radioimunoensaio foram adquiridos da *Gênese Produtos Farm. E Diagnósticos Ltda.* (Texas, USA). O kit para dosagem plasmática de glicose (*glicose PAP liquiform (84) ix 500 ml*) foi adquirido da *Centerlab central de laboratórios LTDA. São Paulo, Brasil*.

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA HISTOLOGIA:

Fixador Carnoy: preparo para o tratamento histoquímico das lâminas tratadas com α -amilase e ácido periódico de Schiff (PAS). Contém: Álcool, 100% 60ml, Clorofórmio 30ml e ácido acético glacial 10ml.

Solução de ácido periódico: 05% (W/V); ácido periódico 50 mg dissolvida em água destilada 10ml.

Reagente de Schiff: 1g de afuccina básica, água destilada 200ml, 20 ml de 1-N HCL, 1 g de matabissulfito de sódio e 2 g de carvão ativado.

Solução de amilase: Amilase a 2% em solução aquosa de NaCl a 4%.

SOLUÇÕES UTILIZADAS NA ANÁLISE BIOQUÍMICA DO GLICOGÊNIO:

Solução KOH 30% para a digestão e determinação do conteúdo de glicogênio por método colorimétrico e posterior reação com o reagente de antrona 2% após hidrólise ácida do polímero.

Solução de Antrona: 200 mg de antrona e 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4).

SOLUÇÕES UTILIZADAS NO IMUNOBLOTTING:

Solução tampão de extração (para imunoprecipitado e extrato total): utilizada para extração de proteínas celulares dos tecidos estudados. Contém: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X- 100 1% e 0,01mg/ml de aprotinina. Após a elaboração, solução foi mantida a 4°C, sendo que o ortovanadato, o PMSF e a aprotinina foram acrescidos no momento do uso.

Solução tampão para lavagem do imunoprecipitado: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 2 mM e triton X-100 0,5%.

Tampão de Laemmli (5X): usado para estocar o material extraído e sua posterior aplicação no gel de poliacrilamida para eletroforese (SDS-PAGE), contém: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), contém: trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Para uso, a solução foi diluída 1:4.

Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose; contém: trisma base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4°C.

Solução tampão para SDS-PAGE – Gel de resolução (*resolving*): tampão composto de EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

Solução tampão para SDS-PAGE – Gel da fase de empilhamento (*stacking*) das proteínas: contém: EDTA 4mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

Solução Basal: solução utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas, contém: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, *tween* 20 0,02%.

Solução Bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose, após a transferência, contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, dissolvidos em solução basal.

Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que identificaram as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contém 0,03% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02%, diluídos em solução basal. Foi utilizado o anti-corpo anti-AMPK α 1 e 2 (1:1000).

ANIMAIS:

Foram utilizados ratos machos albinos da raça Wistar, adultos, com oito semanas de vida, pesando entre 200 e 280g no início dos experimentos. Os animais utilizados foram adquiridos no biotério central da UNIFESP (Escola Paulista de Medicina), e mantidos no biotério do laboratório de neurofisiologia durante todo o período experimental. Os animais foram alojados em grupos de até cinco ratos, em caixas apropriadas, onde tiveram livre acesso a água e comida. As condições do biotério obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro:07:00-19:00), sendo a temperatura ambiente mantida constante entre 21 e 22°C.

FAMILIARIZAÇÃO AO ERGÔMETRO

Os animais foram familiarizados em uma esteira rolante de seis pistas individuais, modelo AVS (AVS projetos São Paulo, Brasil) por 3 dias consecutivos, correndo numa velocidade de 10 metros/min durante 10 min/dia com 0% de inclinação. Os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UNIFESP- EPM foram observados, tendo recebido aprovação para execução. Processo CEP nº: 2031/07.

Para determinar uma medida de treinabilidade nos animais, uma escala de desempenho na esteira de 1 a 5, classificada por Dishman e colaboradores (Dishman, Armstrong *et al.*, 1988), foi realizada: 1= o animal se recusa a correr, 2= corrida sem constância (corre e para ou corre em direção errada), 3= corrida regular, 4= corrida boa (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira), 5= corrida excelente (corre permanentemente na parte da frente da esteira). Os animais com uma classificação média de 3 ou mais foram incluídos neste estudo. Este procedimento foi empregado para excluir possíveis níveis diferentes de estresse.

Os animais selecionados ($n=24$) foram divididos dentro de quatro grupos: grupo treinado (T), composto por 10 animais que foram submetidos ao treinamento progressivo de corrida em esteira, cinco dias por semana durante doze semanas; grupo treinado exaustão (TE), composto por 10 animais que foram submetidos ao mesmo protocolo de treinamento que o grupo anterior, com o acréscimo de um teste de ultraendurance à intensidade de 60% da velocidade máxima até a exaustão (para determinar a intensidade relativa de treinamento (ver descrição de protocolo de teste de velocidade máxima

abaixo); Grupo sedentário (S), composto por 10 animais que não receberam nenhum tipo de treinamento e finalmente, grupo sedentário exaustão (SE), composto por 10 animais não treinados que, somente a partir da 19ª semana de vida foram adaptados à esteira, submetidos a um teste de velocidade máxima e dois dias depois, ao teste de ultraendurance até a exaustão (figura 02).

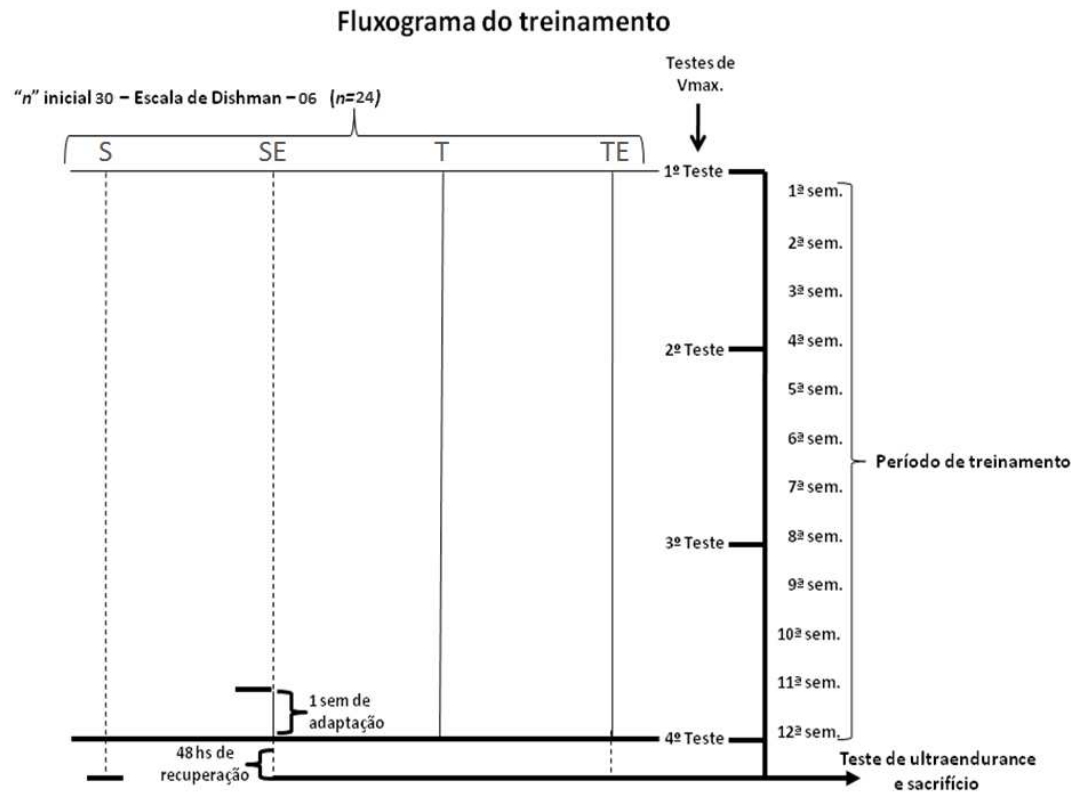


Figura 3 Fluxograma de treinamento. Linha tracejada: período sem treinamento; Linha contínua: período com treinamento. Após escala de Dishman, os animais foram divididos em quatro grupos: Sedentário (S); Sedentário e submetido ao teste de ultra endurance até a exaustão (SE); treinado por 12 semanas (T) e treinado por 12 semanas e submetido a teste de ultra endurance até a exaustão (TE). Teste de velocidade máxima (Vmax).

TESTE DE VELOCIDADE MÁXIMA

Com o intuito de determinar a intensidade relativa de treinamento, estabelecemos uma relação direta entre a velocidade máxima ($V_{M\acute{a}x}$) e o consumo máximo de oxigênio ($VO_2M\acute{a}x$). Segundo (Aoki, Belmonte *et al.*, 2003), a $V_{M\acute{a}x}$ suportada pelo animal corresponde a 100% do $VO_2M\acute{a}x$. Portanto, se a intensidade de treino desejada for de 60% do $VO_2M\acute{a}x$ isto corresponderá a 60% da $V_{M\acute{a}x}$. Este parâmetro foi reavaliado a cada 30 dias com o objetivo de corrigir as intensidades à medida que os animais se adaptassem. Deste modo, a intensidade de treinamento esteve sempre próxima de 60% da $V_{M\acute{a}x}$.

$$“V_{treino} (m.min^{-1}) = [V_{max} (m.min^{-1}) \cdot 60\%VO_{2pico} (l.min^{-1})] \cdot 100\%VO_{2pico}(l.min^{-1})^{-1}”$$

O teste de $V_{M\acute{a}x}$ consistiu de corrida em esteira onde a velocidade inicial foi de 10 metros por minuto (m/min). A cada três minutos, a velocidade foi aumentada a uma taxa de 2 (m/min) até a exaustão. A velocidade máxima registrada após o teste foi aquela sustentada pelo período de três minutos que precedeu a exaustão.

PROTOCOLO DE TREINAMENTO

O treinamento de endurance consistiu de corrida em esteira, cinco dias por semana durante doze semanas. A velocidade aplicada durante a primeira semana foi de 10 (m/min) por 10 minutos. Para produzir adaptação ao treinamento, a velocidade de corrida bem como a duração das sessões foram corrigidas semanalmente de forma alternada. A velocidade foi corrigida em 5 m/min e a duração em 10 min.

TESTE DE ULTRA ENDURANCE

Ao final da 12ª semana, os animais pertencentes aos grupos (TE) e (SE) foram submetidos a um teste de ultraendurance, que consistiu de correr a 60% da $V_{M\acute{a}x}$ até a exaustão. Esta condição foi determinada quando o animal não mais conseguia se manter na dianteira da esteira, apesar dos estímulos produzidos pela grade de choque. O teste foi interrompido após o animal ter recebido dez estímulos em um período inferior a um minuto.

RETIRADA DOS MÚSCULOS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Ao término do teste de ultraendurance, os animais foram decaptados e deles foram retirados os músculos gastrocnêmio de ambas as patas, o sangue e uma amostra do fígado.

As amostras de músculo e fígado foram imediatamente pesadas, em seguida depositadas em microtubos de 1,5 ml, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80°C para a posterior análise da quantidade de glicogênio por método colorimétrico. O sangue foi centrifugado a 2400 rpm por 10 minutos à temperatura de 4° C. O plasma foi retirado e armazenado em freezer -80°C para posterior análise das concentrações de glicose e insulina.

O músculo gastrocnêmio da pata esquerda foi retirado e preso pelas extremidades a uma placa de poliestireno, para então ser congelado em isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Tal fixação, visava preservar o comprimento do músculo durante o congelamento, evitando uma contração das reservas de glicogênio por uma eventual retração.

Após o congelamento das amostras, os músculos foram separados das placas e divididos em três fragmentos. (Figura 03).

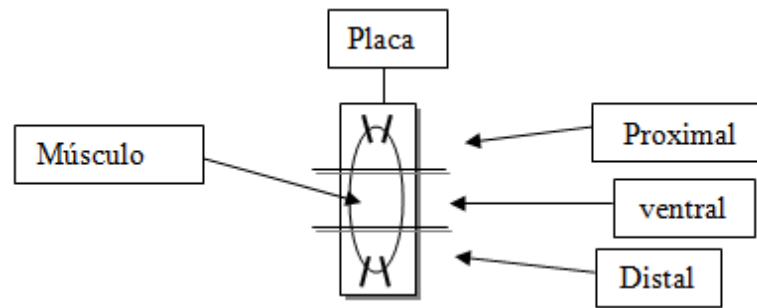


Figura 4 Diagrama da fixação do músculo pelas extremidades à uma placa de poliestireno; Linhas transversais demonstrando a divisão dos três fragmentos.

Foram realizados três cortes transversais seriados com 10 micra (μm .) de espessura de cada um dos fragmentos (proximal, ventral e distal) por meio de um criostato Leica mod. CM 1900.

O primeiro corte de cada fragmento foi utilizado em ensaio imunoistoquímico para miosina de cadeia pesada do tipo I *myosin heavy chain slow* (MHCs) para determinar as alterações na expressão da (MHCs), uma vez que o tipo de treinamento altera a sua expressão, bem como a atividade metabólica celular. Fenômeno este não observado pelo método histoquímico ATPase, para determinação dos tipos de fibras musculares.

Para efeito de comparação, fizemos um tratamento histoquímico com a técnica ATPase num pH de 4,65.

O segundo corte de cada fragmento, foi utilizado como controle negativo para glicogênio, por meio da digestão do polímero com α -amilase e posterior tratamento histoquímico com ácido periódico de Schiff (*PAS*). O terceiro corte de cada fragmento foi tratado histoquimicamente com *PAS*, para a determinação do glicogênio por meio da densidade ótica.

IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DA MIOSINA DE CADEIA PESADA LENTA (MHCS)

Cortes histológicos do gastrocnêmio medial (8 μ m) foram obtidos em criostato a -20°C , transferidos para lâminas silanizadas Star Frost (Waldermar Knittel, Alemanha) e mantidos a temperatura ambiente por 30 min. Os cortes foram mergulhados em tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na_2HPO_4 8,03 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, pH 7,4) por 10 min. Em seguida, foram incubados por 15min com solução de 1% de H_2O_2 para bloqueio da peroxidase endógena, seguido de 3 lavagens de 5 minutos cada. A biotina tecidual endógena foi bloqueada utilizando-se o Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). Em seguida, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, a temperatura ambiente por 1 h, com tampão de bloqueio (tampão PBS contendo saponina 0,01% e albumina 3%). Após lavagem com tampão PBS por 5 min, as lâminas foram incubadas a 4°C por 14-16 h com anticorpo primário contra MHCs (1:150) diluído em tampão de bloqueio. Após 6 lavagens de 5 min cada com tampão de bloqueio, as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 h com o anticorpo secundário conjugado com biotina (1:200) diluído em tampão de bloqueio. O sistema Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories) foi utilizado para evidenciar o imunocomplexo formado pelo anticorpo secundário ligado ao anticorpo primário, de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. Para tal, as lâminas foram incubadas a temperatura ambiente por 1,5 h com avidina-biotina. Após 6 lavagens de 5 min cada com tampão PBS, as lâminas foram reveladas por 3 min com solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (0,5 mg/ml) contendo H_2O_2 0,01%. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas com tampão PBS, secas a temperatura ambiente, contracoradas com azul de

metileno (0,03% em tampão PBS) e montadas em Permount (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EUA). Os resultados foram visualizados em microscópio Nikon 50i. As imagens foram capturadas por câmera digital e analisadas com programa de documentação Image-Pro Express (Media Cybernetics). Cada experimento foi analisado de forma independente e as análises foram compiladas em uma avaliação final da distribuição celular da MHCs no músculo gastrocnêmio, bem como suas respectivas alterações após os protocolos de treinamento e exercício de ultraendurance até a exaustão. A avaliação final foi utilizada para a escolha das figuras que melhor representassem os padrões de imunorreatividade para o anticorpo contra MHCs, observado nos cortes de gastrocnêmio medial de ratos dos diferentes grupos experimentais, nos diferentes experimentos realizados. Peptídeos bloqueadores para os anticorpos contra MHCs foram usados como controle negativo para confirmar a especificidade das marcações. Neste caso, o excesso de peptídeo bloqueador (5 vezes a concentração do anticorpo primário) foi previamente incubado a 4°C por 12-14 h com o respectivo anticorpo primário em tampão de bloqueio.

HISTOQUÍMICA:

Para obtermos maior fidedignidade na análise da densidade ótica do glicogênio, foi necessário criar um controle negativo, ou seja, remover o glicogênio de alguns cortes por meio da digestão com α -amilase para posteriormente tratar com a *PAS*, assim ao analisarmos ambos os cortes (com e sem glicogênio), foi possível excluir qualquer interferência na densidade ótica por parte dos demais constituintes presentes na lâmina.

DIGESTÃO DO GLICOGÊNIO COM α -AMILASE E TRATAMENTO COM PAS:

A solução de α -amilase foi derramada sobre as lâminas, de modo que os cortes ficassem completamente cobertos. Em seguida, as respectivas lâminas foram colocadas dentro de uma estufa à temperatura de 37°C por 30 minutos. No passo seguinte, as lâminas foram lavadas em água corrente e posteriormente imersas em álcool absoluto para desidratar os cortes, para posteriormente serem imersas em ácido periódico 0,5% por 15 minutos.

Ao término deste período, as lâminas foram lavadas em água desionizada e mergulhadas no reativo da *Schiff* por 30 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

PAS

Semelhante às últimas etapas descritas no processo anterior, as lâminas designadas para a determinação do glicogênio foram imersas em álcool absoluto, para desidratar os cortes, para posteriormente serem imersas em ácido periódico 0,5% por 15 minutos.

Ao término deste período, as lâminas foram lavadas em água desionizada e mergulhadas no reativo da *Schiff* por 30 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

BATERIA DE MONTAGEM DAS LÂMINAS

Para a montagem das lâminas, foram realizados três banhos com álcool absoluto, seguidos de três banhos em xilol. As lamínulas foram fixadas às lâminas com Entelan®.

DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE ÓTICA

Para a determinação da densidade ótica, foram fotografadas as lâminas por meio de um microscópio trinocular modelo 50i Nikon (Japão) equipado com uma câmera digital modelo DSFLi U2 Nikon (Japão). A análise das fotos foi realizada por meio do software Image J versão 1.43o Wayne Rasband National Institutes of Health, (USA).

Para tanto, foi necessário calibrar o software por meio de uma figura padronizada com uma escala de cinza de 21 tonalidades, onde a densidade ótica variou de 0,05 a 3,05 graus. Ao final da calibração, o software passou a converter os valores de “*Pixels*” em graus de densidade ótica.

O procedimento seguinte foi converter as fotos das lâminas em escalas de cinza.

Para obtermos apenas a densidade ótica do glicogênio, adotamos o seguinte critério: primeiramente medimos a densidade ótica das lâminas tratadas com amilase. Em seguida, medimos a densidade ótica das lâminas tratadas com PAS. Os valores da densidade ótica do glicogênio foram obtidos a partir da subtração da densidade ótica do PAS e da α -amilase. No primeiro momento foram identificados os diferentes subtipos de fibras musculares por meio da análise da imunoistoquímica da MHCs para posteriormente determinar a densidade ótica por tipo de fibra. Como dispunhamos apenas do reagente para MHC do tipo I, optamos por não classificar os demais tipos de fibras musculares. A análise consistiu de circundar e medir a densidade ótica de cada fibra individualmente. Foram inspecionadas cerca de 1200 fibras musculares por grupo.

O músculo gastrocnêmio da pata direita foi dividido em três partes, sendo a primeira imediatamente pesada e separada para a quantificação do glicogênio por método colorimétrico.

As outras duas amostras foram homogeneizadas em tampão de extração e em trizol e posteriormente submetidas à immunoblotting e *realtime* RT-PCR respectivamente, para a quantificação da proteína AMPK na sua forma fosforilada bem como sua expressão gênica.

QUANTIFICAÇÃO DO GLICOGÊNIO HEPÁTICO E MUSCULAR POR MÉTODO COLORIMÉTRICO:

Foram separadas e pesadas 250 gr do fígado e do músculo gastrocnêmio e posteriormente incubadas com KOH 30% por uma hora em banho a 90°C. As amostras foram então retiradas e homogeneizadas por meio de um politron para posteriormente receberem 100 µl de Na₂SO₄ saturado. Acrescentou-se 3,5 ml de álcool etílico e homogeneizamos novamente em processador vortrex®. As amostras foram então colocadas em banho até ferver. Em seguida, as amostras foram mexidas com um bastão de vidro até pararem de ferver, e então centrifugadas a 1000 rpm por vinte minutos. Os sobrenadantes foram retirados com bomba de vácuo e desprezados. As amostras foram ressuspensas com água quente. Acrescentou-se 3,5 ml de álcool e centrifugou-se novamente. Os sobrenadantes foram desprezados. 1,0ml das amostras foram ressuspensas em água quente e dissolvidas.

SOLUÇÃO ANTRONA

Para fazer a antrona foram necessários 100ml de H_2SO_4 e ácido sulfúrico puro. Foram lentamente adicionadas 200mg de antrona e posteriormente mexidas com bastão de vidro.

CURVA PADRÃO DO GLICOGÊNIO

Para a realização da curva padrão de glicogênio, elaborou-se a “solução mãe”, com 200mg de glicose e 100ml de água. Foram então separadas em triplicata as seguintes concentrações: 250 μl , 500 μl , 1,0 ml, 1,5 ml e 2,0 ml de solução mãe, sendo que em cada tubo foi adicionado 50 ml de água. As concentrações então foram transferidas para tubos de vidro 1,0 ml de cada concentração, com a adição de 2,0 ml de antrona. Para a elaboração do controle (branco) adicionou-se 1,0 ml de água a 2,0 ml de antrona.

CURVA DE GLICOGÊNIO

Foram transferidos 50 μl de cada amostra para tubos de vidro e adicionados 950 μl de água e 2,0 ml de antrona. Todos os tubos de vidro foram homogeneizados no vortex® e levados a banho à temperatura de 90°C por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotometro. Para tanto, as diferentes concentrações de solução mãe para a curva padrão, bem como as amostras foram depositadas individualmente em cubetas de vidro (1ml) e o comprimento de onda foi calibrado para 650 nm.

O cálculo da quantificação bioquímica do glicogênio por unidade é o seguinte:

$$\text{Gli. (mg/100 mg) de tecido} = 1/MT(\text{mg}) \times \{A(\text{ml}) + H_2O(\text{ml})\} / A(\text{ml}) \times \{\Sigma P(\mu\text{g/ml})\} / \Sigma(\text{abs-br}) \times (\text{abs-br}) \times 100/1000.$$

Onde: Gli-glicose; MT- massa do tecido; A-amostra; P- curva padrão e ΣP - $80+60+40+20+10=210 \mu\text{g/ml}$.

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS E IMMUNOBLOTTING

Para análises da expressão tecidual das proteínas intracelulares do músculo gastrocnêmio, as amostras foram homogeneizadas com polytron em 1,5 ml de tampão de extração constituído de Triton-X 100 1%, Tris (pH 7,4) 100 mM, pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml. Os extratos foram centrifugados a 12000 rpm a 4 °C por 40 minutos para a remoção do material insolúvel.

Após centrifugação, os sobrenadantes das amostras tiveram seu conteúdo protéico quantificado utilizando o reagente de Bradford (BioRad) e em seguida, foram tratados com tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), acrescido de DTT 200 mM, na proporção de 4:1 (V:V) e 50 a 100µg de proteínas totais. Posteriormente, foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10% e 6,5%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel, foi colocado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos.

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, através de um aparelho também da

BioRad por 2 horas a 120 V, como descrito por Towbin e colaboradores (Towbin, Staehelin *et al.*, 1979). Porém no tampão foi acrescido SDS 0,1% para melhorar a diluição de proteínas de alto peso molecular. A ligação inespecífica de proteínas na membrana de nitrocelulose foi diminuída pela incubação destas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,02%) em temperatura ambiente por 2 horas sob leve agitação. Estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos AMPK e mTOR ambos fornecidos por (cell signalling inc.) em solução bloqueadora (com 3% de BSA ao invés de leite) overnight a temperatura de 4 °C sob leve agitação e lavadas com esta mesma solução sem leite ou BSA, por 30 minutos. Em seguida, estas membranas, sob o mesmo padrão de agitação, foram incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase por 1 hora a temperatura ambiente e solução para detecção por quimioluminescência como descrito no protocolo do kit. A intensidade das bandas nas auto-radiografias reveladas foi determinada através da leitura por densitometria óptica das imagens escaneadas utilizando um scanner (XEROX WORKCENTRE 3119) e o programa Scion Image (Scion Corporation).

TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

Para avaliar a expressão gênica de fatores transcricionais mitocondriais e de fatores regulatórios miogênicos serão extraídos RNA totais dos músculos utilizando-se o reagente TRIZOL® (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante (GIBCOBRL Life Technologies). O tecido será inicialmente rompido e homogeneizado em 1,0 mL TRIZOL® por 100 mg de tecido até completa solubilização. Em seguida, a mistura será incubada por 5

minutos em temperatura ambiente, acrescida de 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante será separado por centrifugação (12.000 rpm, 15 minutos, 4 °C) e a fase aquosa será transferida para novo tubo, onde o RNA será precipitado por incubação com 0,5 mL de isopropanol (10 minutos, temperatura ambiente) e por centrifugação (12.000 rpm, 10 minutos, 4 °C). Após a precipitação, o sobrenadante será descartado e adiciona-se 1 mL de etanol 75% para lavagem do RNA. As amostras serão agitadas manualmente e centrifugadas (12.000 rpm, 5 minutos, 4 °C). Após lavagem e centrifugação, o sobrenadante será retirado e o precipitado de RNA será ressecado (10 minutos, temperatura ambiente) e dissolvido com H₂O desionizada previamente tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). Os RNAs obtidos serão quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm, e a pureza das amostras será determinada pela razão dos valores de leitura da absorbância entre em 260 e 280 nm.

Para análise da expressão gênica, amostras de 5 µg de cada RNA serão submetidas à reação de transcrição reversa com primers randômicos. Para isto, serão adicionados em cada amostra 4µL de tampão da enzima (50 mM de Tris-HCl pH 8,3, 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂), 2µL de DTT (10 mM), 1 µL mistura de dNTPs (ATP, CTP, GTP, TTP - 0,5mM cada), 1µL primers randômicos (150ng), 1µL de inibidor de RNase (40U) e a enzima SuperScript II (200U; Invitrogen, EUA), e água DEPC para completar 20 µL. As reações serão incubadas por 50 minutos a 42 °C, seguida de aquecimento a 70 °C por 15 minutos para desnaturação da enzima. A partir dos cDNAs obtidos serão realizadas as curvas com ciclos variados de amplificação para cada primer, com 8 pontos para cada curva. As condições a serem usadas para amplificação e as sequências dos primers estão listadas na Tabela 1. Cada curva será

realizada a partir de 94 μ L de Master-Mix contendo tampão de reação, $MgCl_2$, dNTPs e taq DNA polimerase, nas concentrações recomendadas pelo fabricante (Invitrogen, EUA), acrescido de 3 μ L de cDNA e 4 μ L de uma mistura de primers sense (direto) e antisense (reverso) (10 μ M). Esta solução será dividida em 8 tubos de reação com 12 μ L em cada um, e submetida a ciclos de amplificação em termociclador (Multicycler, Eppendorf, Alemanha). Ao final de cada ciclo desejado, o tubo correspondente será retirado do aparelho e mantido a 4 °C até sua utilização. Em todas as reações serão realizadas desnaturações iniciais a 95 °C por 2 minutos, seguidas dos ciclos de desnaturação (95 °C, 30 segundos), anelamento (temperaturas listadas na Tabela 1, tempos de 30 segundos) e extensão (72 °C, 30 segundos), onde a DNA polimerase é ativada e o DNA alvo é utilizado como molde para a incorporação dos dNTPs livres no meio ao longo da fita. Após obtenção das curvas, os experimentos serão realizados com um número de ciclos equivalente a, no mínimo, 20% abaixo do ponto de saturação da reação (platô).

Os produtos amplificados serão submetidos à eletroforese em gel de agarose-EtBr e visualizados com iluminação UV. As imagens serão adquiridas em equipamento de fotovideodocumentação (UVP Bio-Imagin System). A análise densitométrica das bandas obtidas será realizada com software apropriado para este fim (Scion Image). A expressão dos genes de interesse será normalizada pela expressão de genes constitutivos dos quais serão usados 2 opções iniciais: ciclofilina (Aragno et al., 2004; 2006) e GAPDH (Nakamura, et al., 2004). Como alternativa, caso haja modificação pelo tratamento com DHEA, serão usados outros genes constitutivos de uso rotineiro: ATP5^o, EIFLA, GPS1 e HDAC-1. A apresentação dos resultados

será feita através do cálculo da razão entre os valores da densitometria dos genes de interesse e do gene constitutivo.

Tabela 1. *Sequência dos primers para RT-PCR e condições das reações utilizadas.*

<i>Primers</i>	<i>Sense</i>	<i>Anti-sense</i>
AMPK α 1	AGATCGGCCACTACATCCTG	TCTGGATCTCTCTGCGGATT
AMPK α 2	GAACATGGCTGAGAAGCAGA	ACTGCCACTTTATGGCCTGT
MTOR	CCCCCTACCACTGAGAGATG	CAGCTCTCCGAAGTGTTTCA

DETERMINAÇÃO DA INSULINA PLASMÁTICA POR RADIOIMUNOENSAIO:

A insulina secretada durante os diferentes experimentos foi determinada por RIE. Para isso transferiu-se 0,1 ml das amostras (em duplicata) para tubos de ensaio, adicionando-se 0,2 ml de uma solução contendo anticorpo anti-insulina (1:300,000) e insulina marcada com ^{125}I (1800 a 2000 cpm) (traçador) em tampão fosfato pH 7,4, acrescido de NaCl 0,9 % e albumina 0,5 %. Em seguida, foram preparados os seguintes controles:

- 3 tubos (totais) que receberam somente 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I para averiguação da radiação máxima.
- 3 tubos (ligação não específica) contendo 0,2 ml do tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e 0,1 ml de tampão fosfato, para determinar possíveis interferências no ensaio pelos componentes do tampão.

c) 3 tubos (referência) contendo 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada com ^{125}I e anticorpo anti-insulina e 0,1 ml de tampão fosfato, constituindo assim zero de insulina da curva padrão.

Em seguida preparou-se, também em triplicata, uma série de tubos (curva padrão), contendo 0,1 ml de insulina conhecida nas seguintes concentrações: 0,02; 0,039; 0,078; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,5 e 5,0 ng/ml. Cada tubo dessa série recebeu também 0,2 ml de solução tampão fosfato contendo insulina marcada ^{125}I e anticorpo anti-insulina. No final da preparação dos tubos, eles foram agitados em vórtex e estocados a 4°C, durante 48 horas.

Após esse período de incubação, com exceção dos totais para análise da radiação máxima, todos os outros tubos receberam 0,2 ml de uma solução contendo 2,5 % de carvão (Norit A), 0,5 % de albumina e 0,25 % de dextran T 70. Os tubos foram deixados em repouso durante 20 minutos e a seguir centrifugados durante 20 minutos (2800 rpm) a 4°C. O sobrenadante foi descartado e a radioatividade contida em cada tubo avaliada em contador de radiação gama. Os 3 tubos elaborados para análise da radiação máxima não tiveram o sobrenadante descartado, sendo a radiação dos mesmos avaliada diretamente. Com bases nos valores obtidos nos tubos contendo insulina conhecida, elaborou-se uma curva padrão que foi utilizada para a avaliação dos valores das amostras. Os resultados foram expressos em ng/ml de insulina secretada durante os experimentos.

DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA POR MÉTODO COLORIMÉTRICO.

A concentração de glicose no soro foi determinada em duplicata através de kit comercial (Glicose Pap Liquiform, Labtest Diagnóstica) com limite de

detecção de 0,41 mg/dL. O método baseia-se na reação, catalisada pela glicose oxidase, de oxidação da glicose presente na amostra, produzindo ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. A adição de peroxidase proporciona a formação de composto de cor vermelha, detectado no espectrofotômetro a 505 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

Para tanto, amostras de sangue foram colhidas e acondicionadas em tubos heparinizados, que em seguida foram centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos para a separação do soro. Para a realização do experimento, foram utilizados três tubos de ensaio para cada amostra, intitulados da seguinte forma: *branco*, *teste* e *padrão*.

No tubo de ensaio *branco* colocou-se apenas 1,0 ml de reagente enzimático, no tubo *amostra* colocou-se 0,01 ml da amostra e 1,0 ml de reagente enzimático e no tubo *padrão*, colocou-se 0,01 ml de solução padrão e 1,0 ml de reagente enzimático. O procedimento foi repetido com cada amostra. As amostras foram então homogeneizadas e colocadas em banho-maria à temperatura de 37° C durante 15 minutos. Em seguida, determinaram-se as absorbâncias das soluções *teste* e *padrão* em espectrofotômetro num comprimento de onda de 505 nm, onde o valor de *zero* foi ajustado com o *branco*.

Para o cálculo da glicose, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Glicose (mg/dl)} = (\text{absTeste} - \text{absPadrão}) \times 100$$

DETERMINAÇÃO DA CITRATO SINTASE POR ENSAIO ENZIMÁTICO

A atividade da enzima citrato sintase foi determinada a partir do grupamento SH usando 5, 5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico- DTNB) 100mg de músculo gastrocnêmio foram homogeneizados em PBS e centrifugados

durante 10 minutos 1000Xg, à temperatura de 4°C. Para a reação foram utilizados 100µl de 1mM de DTNB, dissolvidos em 10ml de 1 M de Tris/HCl (pH 8.1), 30 µl de 10 mM Acetil-CoA, dissolvidos em água de Milli Q, 200 µl e 800 µl da solução (1mM de EDTA/Triton X100 0.05%, pH de 7.4, 37°C). A atividade foi medida numa absorbância de 412 nm por 3 minutos com incubação de 7 minutos. O processo é repetido e a atividade da CS iniciou-se quando foram adicionados 50 µl de oxalacetado, dissolvidos em 0,1 M-tris/HCl. Foi utilizado um coeficiente de absorção de 13.600M.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a realização da análise dos dados, foi utilizado o pacote estatístico *SAS Statistical Analysis System*, versão 9.0 *for Windows*. Os dados foram expressos como médias e erro padrão. Foi realizada a análise de variância de dupla entrada (*ANOVA twoway*) de todos os grupos a partir das variáveis “treinamento e exaustão”. Quando foi encontrado um valor significativo de F, o teste *Post hoc* de Tukey foi aplicado.

O teste “*t*” de *Student* foi empregado quando necessário.

Para avaliar a correlação entre duas medidas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson. Adotou-se como significância estatística, $p < 0,05$.

RESULTADOS

MASSA CORPORAL

Os animais submetidos ao treinamento durante 12 semanas (grupos T e TE) apresentaram redução significativa de peso ($394,17 \pm 4,09$ e $394,5 \pm 2,93$) quando comparados aos animais dos grupos não treinados (S e SE) ($402 \pm 4,46$ e $412,17 \pm 2,98$) ($p < 0,05$) gráfico 1.

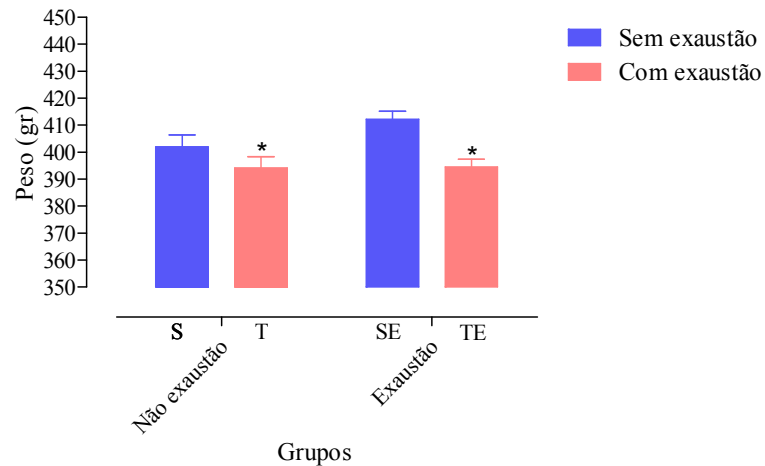


Gráfico 1. ANOVA two way. Valores representados como médias \pm erro padrão da média. Peso corporal ao final do estudo. S: sedentário, T: treinado, SE: sedentário exaustão e TE: treinado exaustão. * Diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$).

TEMPO DE TESTE

Os animais do grupo sedentário exaustão (SE) fadigaram mais rapidamente no teste de ultra endurance, quando comparados aos animais do grupo Treinado exaustão (TE) $p < 0,05$ ($105,7 \pm 7,36$ vs. $180,5 \pm 12,86$ minutos). Gráfico 2.

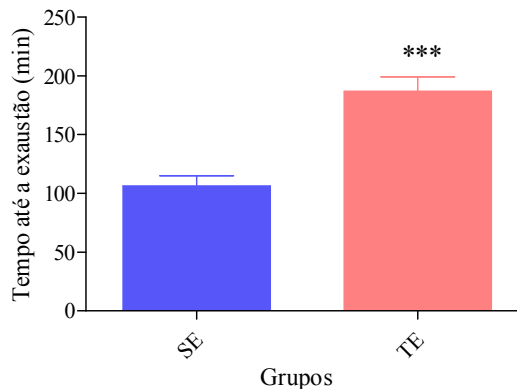


Gráfico 2. Teste t de Student. Valores representados como médias \pm erro padrão da média. Tempo decorrido em minutos ao atingir a exaustão em teste de ultra endurance. SE: sedentário exaustão e TE treinado exaustão. *** Diferença estatisticamente significante ($p < 0,001$).

VELOCIDADE

O gráfico 3 apresenta os valores de velocidade empregados no teste. A velocidade de teste também foi estatisticamente maior no grupo TE ($18,4 \pm 2,01$ vs. $26,2 \pm 2,57$ m/min respectivamente) ($p < 0,05$).

TRABALHO TOTAL

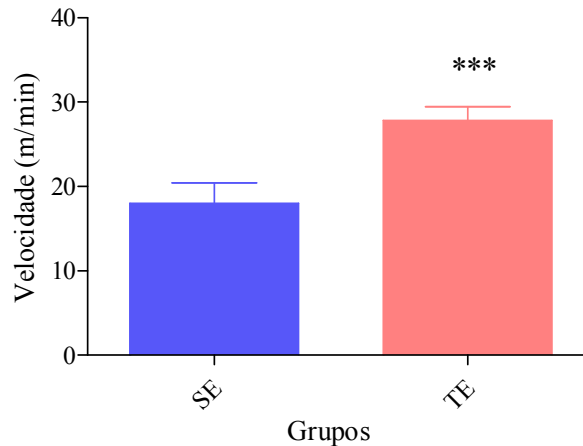


Gráfico 3. Test *t* de Student. Valores representados como médias \pm erro padrão da média. Velocidade em Metros por minuto empregada durante o teste de ultra endurance até a exaustão. SE: sedentário exaustão e TE treinado exaustão. *** Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

A análise do trabalho total (gráfico 4) mostrou um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,0001$) do grupo TE em relação ao grupo SE durante o teste de ultra endurance.

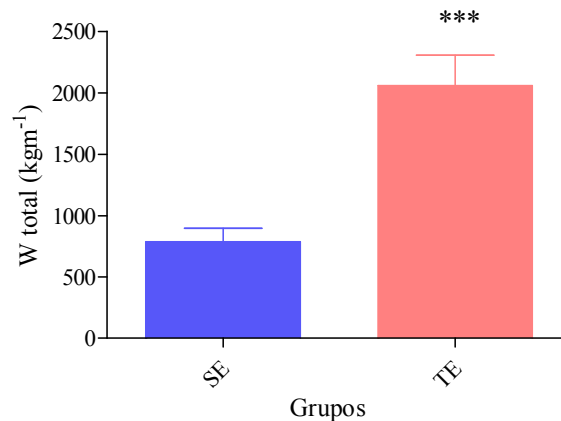


Gráfico 4. Teste *T* de Student. Valores representados como médias \pm erro padrão da média. Trabalho total em kilogramas por metro por minuto obtido durante o teste de ultra endurance até a exaustão. SE: sedentário exaustão e TE treinado exaustão. *** Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

GLICOGÊNIO INTRAMUSCULAR

O conteúdo de glicogênio intramuscular (gráfico 5) diminuiu significativamente ($p < 0,001$) nos grupos SE e TE ($S = 0,213 \pm 0,003$; $T = 0,203 \pm 0,007$; $SE = 0,031 \pm 0,006$; $TE = 0,028 \pm 0,006$ mg/g proteína) quando comparados aos grupos S e T.

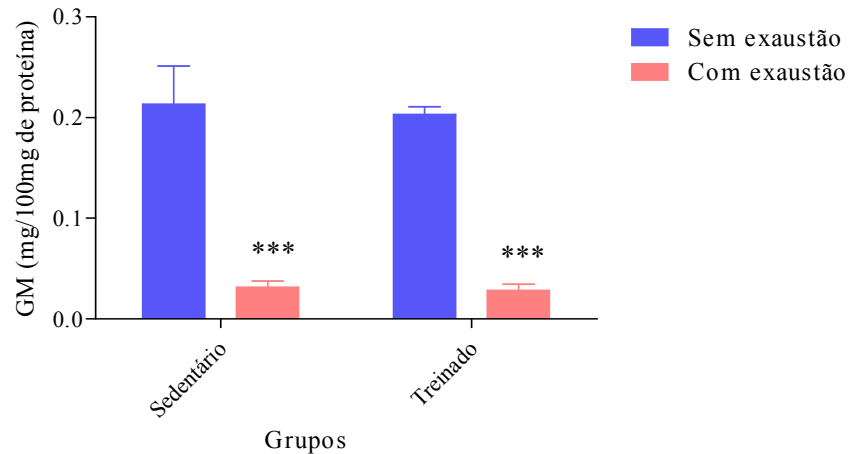


Gráfico 5. ANOVA two way. valores representados como médias \pm erro padrão da média. Glicogênio muscular em miligramas por cem miligramas de proteína. *** Diferenças estatisticamente significantes provenientes dos grupos SE e TE quando comparados com os grupos S e T ($p < 0,001$).

GLICOGÊNIO HEPÁTICO

O Glicogênio hepático aumentou no grupo T quando comparado ao grupo S ($p < 0,004$). Porém, o grupo TE sofreu uma redução significativa quando comparado ao grupo T ($p < 0,001$), bem como quando comparado ao grupo S ($p < 0,05$) gráfico 6.

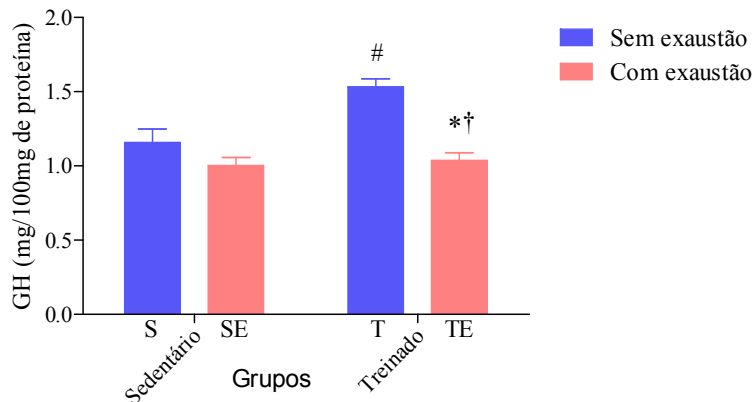


Gráfico 6. ANOVA two way. valores representados como médias \pm erro padrão da média. Glicogênio hepático em miligramas por cem miligramas de proteína. * Diferenças significantes provenientes da interação dos fatores treinamento e exaustão ($p < 0,05$), # diferenças significantes provenientes do treinamento, quando comparado ao grupo S ($p < 0,004$) e † diferenças significantes provenientes do grupo TE em relação ao grupo T ($p < 0,001$).

GLICOSE E INSULINA PLASMÁTICA

O conteúdo de glicose plasmática apresentou alteração significativa após o exercício exaustivo somente no grupo TE ($p < 0,05$). Enquanto que os valores de insulina plasmática foram semelhantes para todos os grupos (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação dos níveis de glicose (mg/dl) e insulina plasmática entre grupos. *S: sedentário, SE: sedentário exaustão, T: treinado e TE treinado exaustão. *Diferença estatisticamente significativa observada no grupo TE quando comparado ao grupo S ($p < 0,05$).*

<i>Grupos</i> ($n=6$)	<i>S</i>	<i>SE</i>	<i>T</i>	<i>TE</i>
<i>Glicose</i> (mg/dl)	90,43 ± 2,47	85,75 ± 3,18	84,84 ± 2,19	76,02 ± 5,60*
<i>Insulina</i> (ng/ml)	0,89 ± 0,04	0,92 ± 0,06	0,91 ± 0,04	0,93 ± 0,05

A atividade da enzima citrato sintase não apresentou alteração estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Foi possível observar pelos valores obtidos (tabela 3), que a amostra sofreu perda de atividade enzimática durante o processo experimental, decorrente de problemas técnicos no momento da análise em espectrofotometria. O equipamento não permitia ajuste de temperatura (37°C).

CITRATO SINTASE

Tabela 3. Atividade da enzima citrato sintase (nmol/mg de proteína) em músculo esquelético (gastrocnêmio) de ratos. Grupos S: sedentário, SE: sedentário exaustão, T: treinado e TE: treinado exaustão. Não houve diferença estatística significativa.

Grupos	S	SE	T	TE
	168,62	129,28	52,94	156,79
	208,92	152,21	0,00	60,77
	187,92	-4,66	108,29	258,10
	197,01	80,70	134,15	137,49
	203,00	149,46	112,47	0,00
	134,95	122,18	76,26	120,19
Médias \pm EPM	183,4 \pm 11,26	104,86 \pm 24,29	96,82 \pm 13,10	146,66 \pm 29,35

HISTOQUÍMICA

A figura 5 apresenta o tratamento histoquímico para ATPase, α -amilase + PAS e PAS dos cortes histológicos de músculo gastrocnêmio. Nas imagens da histoquímica ATPase em pH de 4.65, as fibras escuras são fibras do tipo I. Já, nas imagens da histoquímica PAS, as fibras do tipo I são as mais claras, em função da depleção do glicogênio promovida pelo exercício de ultra endurance até a exaustão. A ausência de coloração observada nas lâminas digeridas com α -amilase e coradas com PAS demonstram as fibras musculares sem glicogênio. Nota-se diferença de tonalidade entre fibras musculares nas imagens de PAS dos grupos SE e TE. Diferença de tonalidade observada nas figuras dos grupos S e T não foi significativa.

IMUNOISTOQUÍMICA

A figura 6 apresenta o tratamento imunoistoquímico para miosina de cadeia pesada de fibras do tipo I (*Myosin Heavy Chain slow* MHCs), como tentativa de substituição da histoquímica ATPase, uma vez que a expressão da isoforma da MHC sofre alteração em função do tipo de treinamento. Fenômeno este, impossível de ser detectado por meio da técnica de histoquímica.

Uma vez que o treinamento foi predominantemente aeróbio, esperava-se uma maior expressão da MHCs inclusive em fibras do tipo II, o que teoricamente melhor explicaria o padrão de depleção de glicogênio das fibras musculares observado na histoquímica PAS.

A imunoistoquímica MHCs não demonstrou melhor relação com o padrão de depleção do glicogênio observado na histoquímica PAS, quando comparado à ATPase (figuras 5 e 6).

Figura 5. Cortes histológicos corados histoquimicamente para: ATPase, α -Amilase e PAS. Grupos S: sedentário, SE: sedentário exaustão, T: reinado e TE treinado exaustão. X400.

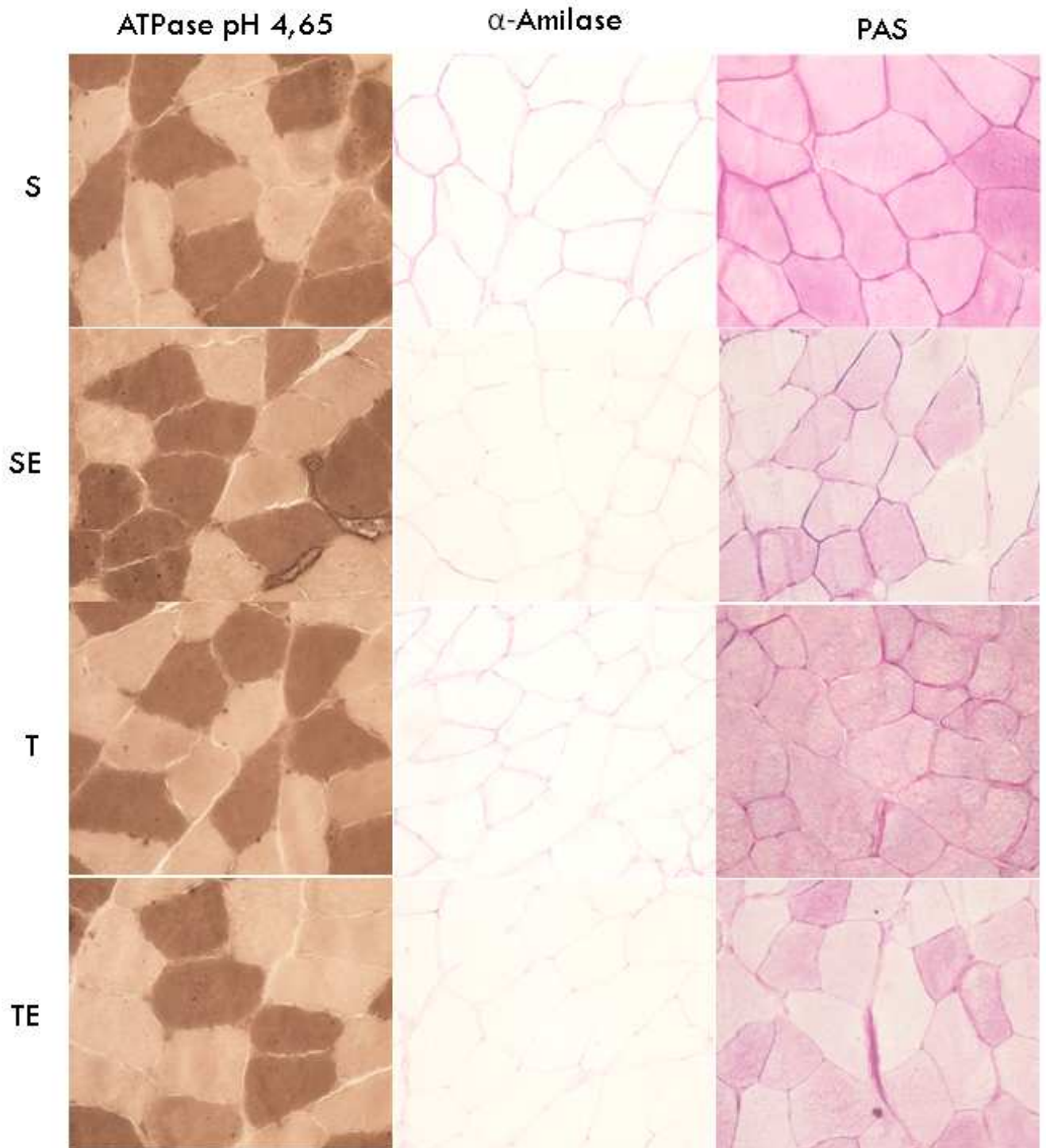
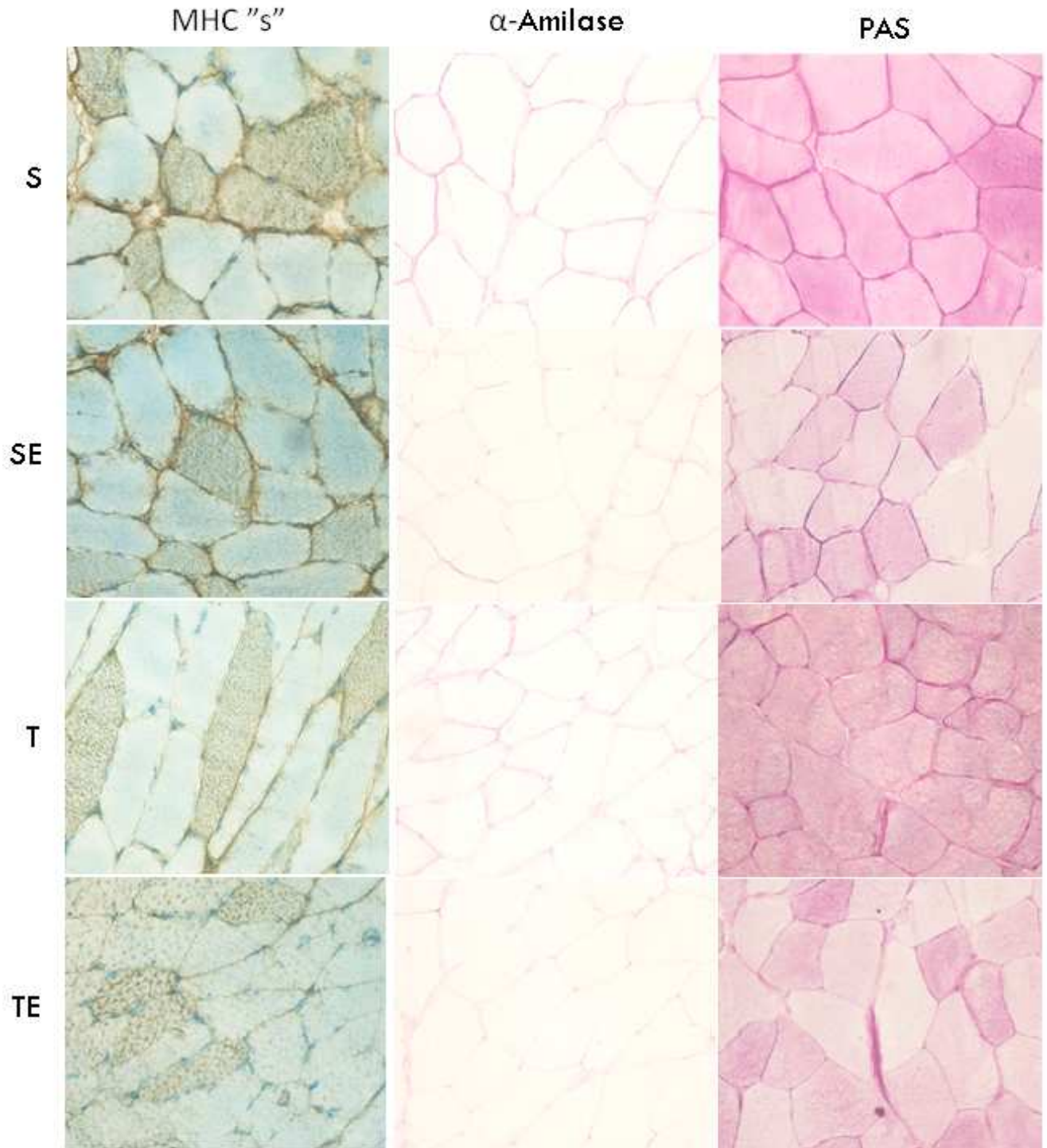


Figura 6. Cortes histológicos corados imunoistoquimicamente para MHCs e histoquimicamente para: α -Amilase e PAS. Grupos S: sedentário, SE: sedentário exaustão, T: reinado e TE treinado exaustão. X400.



DENSIDADE ÓTICA

A tabela 4 apresenta as médias dos valores de densidade ótica das três porções do músculo gastrocnêmio (proximal, medial e distal) da PAS já corrigidos pela densidade ótica da α -amilase.

Tabela 4. *Valores de densidade ótica por tipo de fibra muscular. D.O.: graus de densidade ótica, N° FI: número aproximado de fibras musculares inspecionadas, S: sedentário, SE: sedentário exaustão, T: treinado e TE treinado exaustão. †Diferença estatisticamente significativa quando comparado com as fibras do tipo II dos grupos S, T e TE. *Diferença estatisticamente significativa quando comparado com os valores obtidos dos grupos S e T quanto ao mesmo tipo de fibra. # Diferença estatisticamente significativa quando comparado com os valores obtidos dos grupos S, T e TE quanto o mesmo tipo de fibra ($p < 0,05$).*

Grupos	Fibras do tipo I		Fibras do tipo II	
	N° FI	Média \pm DP	N° FI	Média \pm DP
S	600	25,41 \pm 0,34	600	25,52 \pm 0,42
SE	600	15,55 \pm 0,87†*	600	18,96 \pm 0,69#
T	600	28,17 \pm 0,23	600	28,29 \pm 0,20
TE	600	15,53 \pm 0,60†*	600	27,48 \pm 0,62

Conforme demonstrado no gráfico 7, houve correlação entre a média dos valores de densidade ótica individual, das porções (proximal, medial e

distal) de fibras musculares coradas histoquimicamente com PAS e o conteúdo de glicogênio muscular medido bioquimicamente.

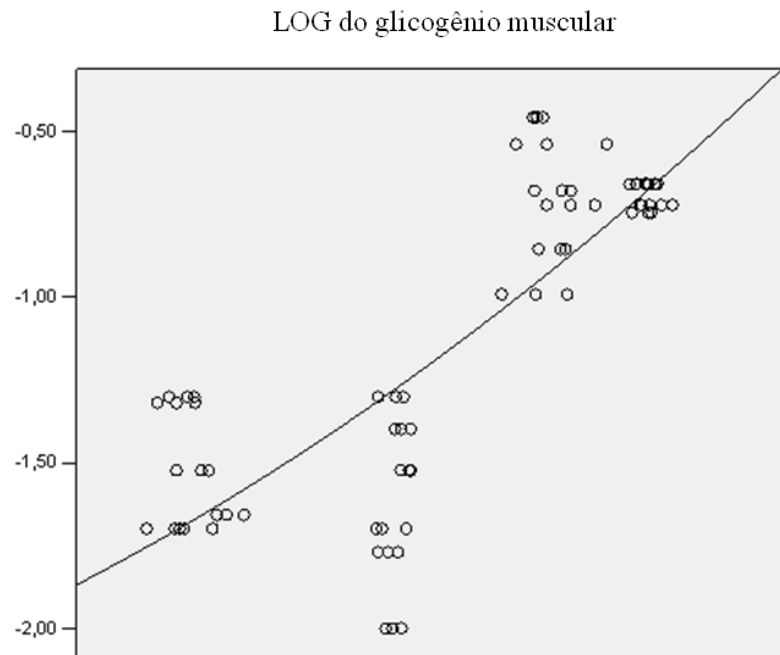


Gráfico 7. Regressão múltipla produzida a partir das médias dos valores individuais de densidade ótica das fibras musculares (porções proximal, medial e distal) coradas histoquimicamente com PAS e o glicogênio muscular medido bioquimicamente $r^2_{ajustado}=0,83$ ($p<0,001$).

Os valores de densidade ótica por tipo de fibra muscular ajustados para valores de glicogênio muscular (mg/100mg de proteína) por meio da regressão múltipla, estão representados no gráfico 8. A variação do glicogênio muscular não ocorre somente em função da densidade ótica, mas também em função do treinamento. A regressão múltipla produziu a seguinte equação:

$$\text{“LogGMusc} = b_0 + b_1DO + b_2\text{Treinament o”}$$

Onde: LogGMus: Log de glicogênio muscular, DO: densidade ótica e o treinamento que é a variável *Dummy*, assumindo dois valores: 1 para sujeitos submetidos ao treinamento e 0 para sujeitos que não foram submetidos ao treinamento.

Os resultados da análise de variância da equação obtida acima (tabela 5) apresentaram valores significativos ($p < 0,001$).

Tabela 5. *Análise de variância (ANOVA) do modelo de regressão múltipla. S. Quad: Soma dos quadrados, G. Lib: Graus de liberdade, M. Quad: média dos quadrados. $P < 0,0001$*

	<i>S. quad.</i>	<i>G.Lib</i>	<i>M. quad.</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Regressão</i>	13.307	2	6.653	174.332	0.001
<i>Residual</i>	2.633	69	.038		
Total	15.940	71			

Uma vez procedida a análise de variância do modelo, os coeficientes foram analisados pelo teste estatístico de *t de student* e se mostraram significativos com ($p < 0,001$) (tabela 6).

Tabela 6. *Coeficientes obtidos pela regressão múltipla. CNP: coeficientes não-padronizados, CP: Coeficientes padronizados B: coeficientes e epm: Erro Padrão da Média. Diferenças estatisticamente significantes $P < 0,0001$.*

	<i>CNP</i>		<i>CP</i>	<i>T</i>	<i>P</i>
	<i>B</i>	<i>epm</i>	<i>Beta</i>		
<i>Constante</i>	-3.5477	.134		-26.4461	0,001
<i>DO</i>	0.1137	.006	1.006	18.6576	0,001
<i>treinamento</i>	-0.4329	.051	-.460	-8.5297	0,001

Os valores obtidos com a regressão múltipla, a partir das médias dos valores de densidade ótica dos segmentos proximal, medial e distal e do glicogênio muscular estão representados na tabela 7.

Tabela 7. *Valores obtidos a partir da regressão múltipla. Análise dos segmentos proximal, medial e distal da densidade ótica do músculo gastrocnêmio. GMus Previsto: valores determinados pela regressão e GMus medido: Log do glicogênio muscular obtido bioquimicamente.*

N		S		T		SE		TE	
		GMus	GMus	GMus	GMus	GMus	GMus	GMus	GMus
		Previsto	Medido	Previsto	Medido	Previsto	Medido	Previsto	Medido
1	Proximal	-0,7075	-0,6778	-0,7824	-0,6576	-1,6565	-1,3188	-1,5222	-1,5229
	Medial	-0,6222	-0,6778	-0,7744	-0,6576	-1,5781	-1,3188	-1,4950	-1,5229
	Distal	-0,5938	-0,6778	-0,7676	-0,6576	-1,6167	-1,3188	-1,4995	-1,5229
2	Proximal	-0,6700	-0,7212	-0,8346	-0,6576	-1,6326	-1,3010	-1,5370	-1,3979
	Medial	-0,5165	-0,7212	-0,7471	-0,6576	-1,5792	-1,3010	-1,4950	-1,3979
	Distal	-0,5950	-0,7212	-0,8119	-0,6576	-1,5940	-1,3010	-1,5211	-1,3979
3	Proximal	-0,7632	-0,5376	-0,8108	-0,6576	-1,6781	-1,6990	-1,5813	-1,3010
	Medial	-0,4779	-0,5376	-0,7449	-0,6576	-1,6008	-1,6990	-1,5143	-1,3010
	Distal	-0,6700	-0,5376	-0,7380	-0,6576	-1,6099	-1,6990	-1,5347	-1,3010
4	Proximal	-0,7120	-0,4559	-0,7926	-0,7212	-1,6167	-1,5229	-1,5859	-1,6990
	Medial	-0,6813	-0,4559	-0,6858	-0,7212	-1,5644	-1,5229	-1,5075	-1,6990
	Distal	-0,7007	-0,4559	-0,7653	-0,7212	-1,5485	-1,5229	-1,5700	-1,6990
5	Proximal	-0,8064	-0,9914	-0,8255	-0,7447	-1,6201	-1,6990	-1,5813	-1,7696
	Medial	-0,6052	-0,9914	-0,7596	-0,7447	-1,5406	-1,6990	-1,5291	-1,7696
	Distal	-0,7041	-0,9914	-0,7699	-0,7447	-1,6008	-1,6990	-1,5552	-1,7696
6	Proximal	-0,6950	-0,8539	-0,7971	-0,7212	-1,5315	-1,6576	-1,5609	-2,0000
	Medial	-0,6109	-0,8539	-0,7244	-0,7212	-1,4712	-1,6576	-1,5200	-2,0000
	Distal	-0,6268	-0,8539	-0,7653	-0,7212	-1,5099	-1,6576	-1,5438	-2,0000

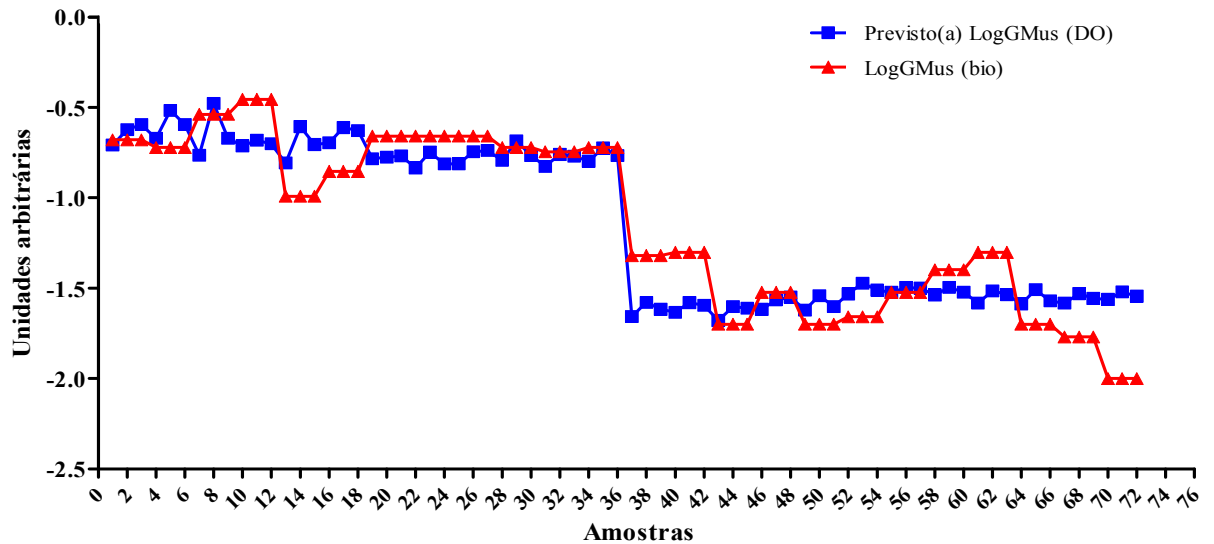
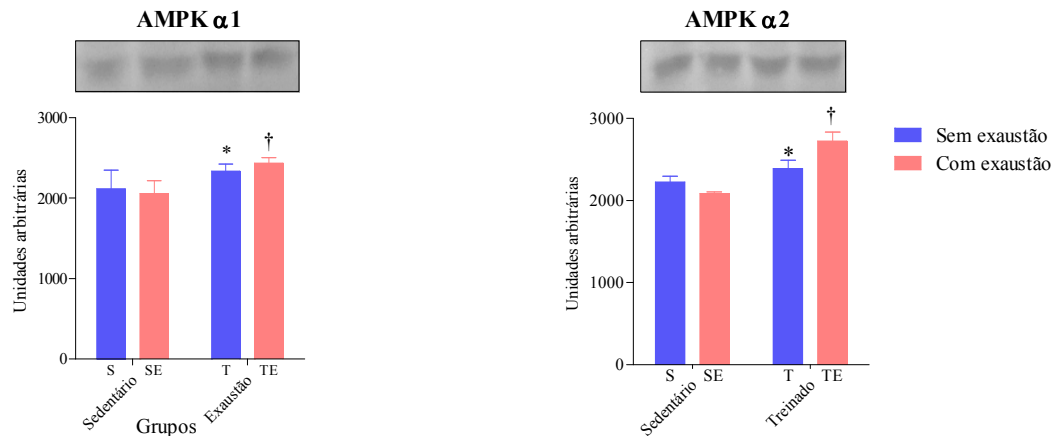


Gráfico 8. Análise comparativa dos valores de glicogênio muscular obtidos bioquimicamente e dos valores obtidos pela regressão múltipla ($r^2_{\text{ajustado}}=0,83$) $p<0,0001$. Valores de log de glicogênio muscular apresentados em triplicata representam as porções proximal, medial e distal do músculo gastrocnêmio.

EXPRESSÃO PROTÉICA (AMPK)

Os gráficos 9 e 10 representam os valores de expressão protéica da proteína AMPK $\alpha 1$ e 2. As representações gráficas da densitometria óptica realizada em auto-radiografias do experimento estão representadas no gráfico



Gráficos 9 e 10. ANOVA two way. Expressão protéica da proteína AMPK. *Diferenças estatisticamente significantes provenientes do treinamento, quando comparado aos grupos S e SE ($p<0,05$). † Diferenças estatisticamente significantes provenientes da interação treinamento/exaustão, quando comparados aos grupos S, T e SE ($p<0,05$).

de barras. Os valores estão expressos como média \pm EPM.

A expressão das proteínas AMPK $\alpha 1$ e 2 apresentaram alteração significativa em decorrência do treinamento quando comparado ao grupo controle. Houve também diferença estatisticamente significativa proveniente da interação entre treinamento e exaustão. Não houve diferença estatística significativa quando comparamos a expressão protéica da AMPK $\alpha 1$ com $\alpha 2$.

EXPRESSÃO PROTÉICA (mTOR)

A expressão protéica da proteína mTOR apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) proveniente do exercício exaustivo, bem como da interação treinamento exaustão (gráfico 11).

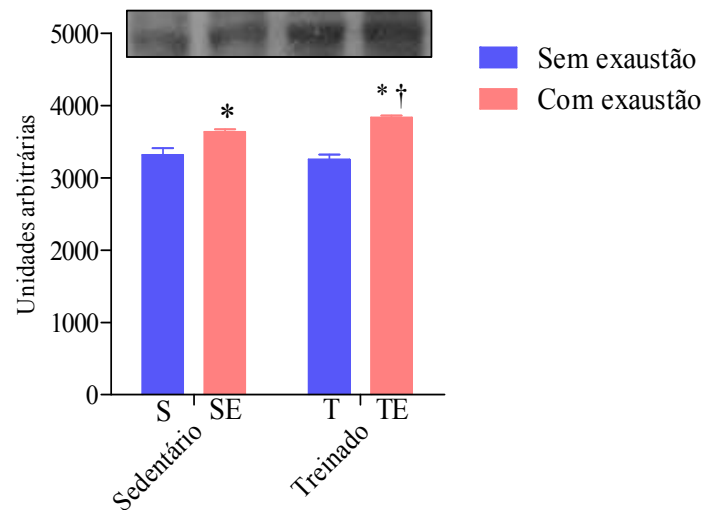
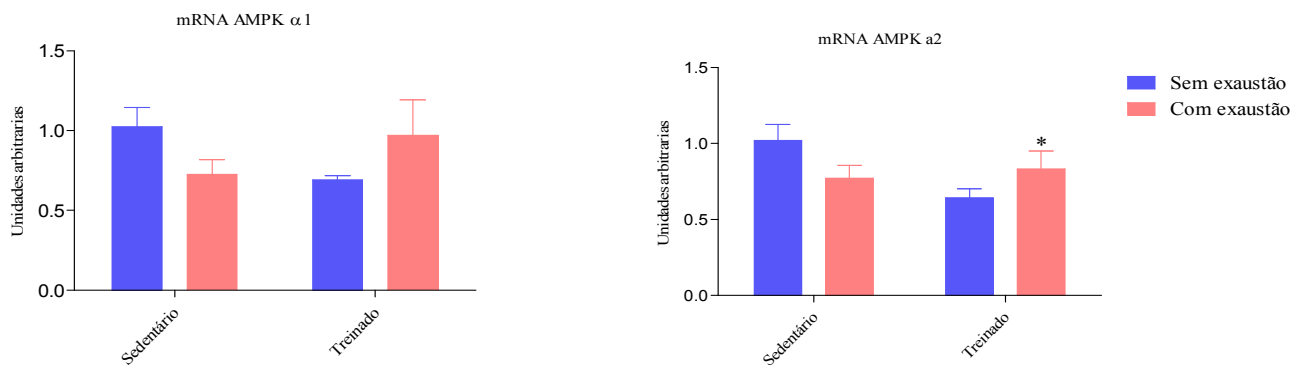


Gráfico 11. ANOVA two way valores representados como médias \pm erro padrão da média

*Diferença estatisticamente significativa proveniente da exaustão, quando comparado aos grupos S e T. ($p < 0,05$). † Diferença estatisticamente significativa proveniente da interação treinamento/exaustão (grupo TE) quando comparado aos demais grupos. ($p < 0,05$).

EXPRESSÃO DE RNA mensageiro (AMPK)

A expressão de RNA mensageiro das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da proteína AMPK apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo TE (gráficos 12 e 13).



Gráficos 12 e 13. ANOVA two way. Expressão de RNA mensageiro das subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2$ da proteína AMPK. Valores representados como média \pm erro padrão da média *Diferença estatisticamente significativa proveniente da interação entre o treinamento e exaustão (grupo TE) quando comparado aos grupos SE e T ($p < 0,05$).

EXPRESSÃO DE RNA mensageiro (mTOR)

A expressão de RNA mensageiro da proteína mTOR está representada no gráfico 14. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

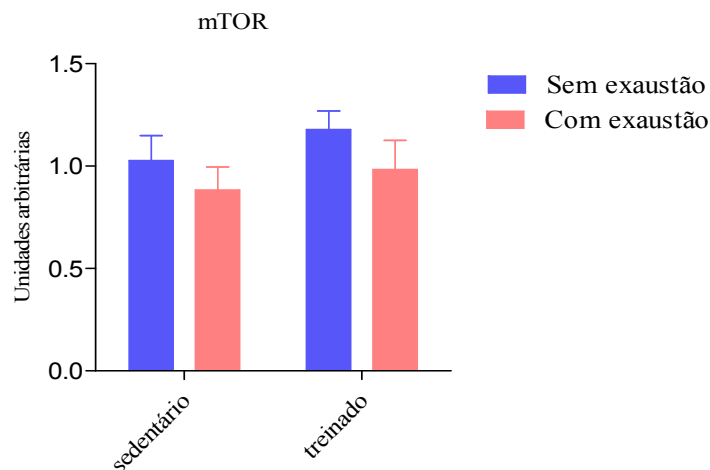


Gráfico 14. ANOVA two way. Valores representados como médias \pm EPM. Expressão de RNA mensageiro da proteína mTOR. Grupos: Não houve diferença significativa entre os grupos.

DISCUSSÃO

O presente estudo verificou o efeito do exercício de ultra endurance sobre as reservas de glicogênio intramuscular e a expressão protéica e gênica da proteína AMPK após o exercício agudo e crônico. Nossos resultados mostraram que o exercício de ultra endurance levado até a exaustão depletou o glicogênio intramuscular, predominante nas fibras do tipo I, assim como provocou um aumento da expressão protéica e gênica da proteína AMPK em animais treinados e submetidos a exercício de ultra endurance.

Dentre as alterações fisiológicas induzidas pelo treinamento prolongado, a redução do peso corporal se destaca (Melton, Keenan *et al.*, 2005). Em um estudo realizado com ratos da mesma espécie, foram investigados os efeitos de um programa de 10 semanas de treinamento de endurance em esteira sobre o tamanho do coração e o peso corporal. Os ratos treinados por 10 semanas apresentaram peso corporal em média 25% menor quando comparados aos animais do grupo não-treinado (O'brien, 1981). Em nosso estudo, os animais foram submetidos a 12 semanas de treinamento e também apresentaram peso corporal significativamente menor quando comparado com os não-treinados (gráfico 1).

O tempo decorrido durante o teste de ultra endurance até a exaustão foi muito maior no grupo TE quando comparado ao grupo SE (gráfico 2). Esta diferença se deve às adaptações neuromusculares e cardiorrespiratórias induzidas pelo treinamento. Neste sentido, Fitzsimons e colaboradores encontraram melhora da economia de corrida em ratos após treinamento prolongado em esteira (Fitzsimons, Bodell *et al.*, 1990). Musch e colaboradores também observaram melhora significativa da economia de corrida, bem como do $\dot{V}\text{O}_2$ máx de ratos infartados após 10 semanas de

treinamento de corrida em esteira em intensidades entre 70 e 80% do $\dot{V}\text{O}_2$ máx (Musch, Moore *et al.*, 1989). Embora não tenhamos medido o consumo máximo de oxigênio, monitoramos a evolução da aptidão dos animais por meio do teste de velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$), variável esta que apresenta comportamento linear em relação ao $\dot{V}\text{O}_2$ máximo (Aoki, Belmonte *et al.*, 2003). A intensidade empregada nos treinos, bem como no teste de ultra endurance até a exaustão foi de 60% da $V_{\text{máx}}$ evidenciada nos teste.

A velocidade relativa (gráfico 3) também apresentou diferença estatisticamente significativa no grupo TE quando comparado ao grupo SE ($18,4 \pm 2,01$ vs. $26,2 \pm 2,57$ m/min respectivamente) com um $\Delta\%$ de 29,77. Considerando que a intensidade de treino foi de 60% da V_{max} , a resposta ao treinamento correspondeu as expectativas.

Quando relacionamos a variável peso com a distância total atingida em teste, obtivemos o trabalho total (W_{total}) que, semelhante às variáveis tempo e velocidade, também apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Embora o peso dos animais do grupo TE tenha sido menor quando comparado ao peso dos animais do grupo SE, a quantidade de W_{total} produzida por TE foi muito maior (gráfico 4), resultado este, justificado pela grande diferença observada tanto na velocidade de teste, quanto no tempo até a exaustão produzidos por TE quando comparados aos valores do grupo SE.

ANÁLISE BIOQUÍMICA DO GLICOGÊNIO INTRAMUSCULAR

A exaustão observada nos animais submetidos ao exercício prolongado, coincidiu com a depleção das reservas de glicogênio intramuscular (gráfico 5). Os valores de glicogênio dos animais submetidos ao exercício até a exaustão foram significativamente menores quando comparados com os valores de

glicogênio do grupo controle ($p < 0,05$). Nosso resultado foi similar aos estudos que empregaram exercício exaustivo (Gunderson, Wehmeyer *et al.*, 1996; Rosa Neto, Lira *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Neto e colaboradores, foram investigados os efeitos do exercício exaustivo sobre a resposta anti e pró-inflamatória nos tecidos muscular e adiposo de ratos. Após a familiarização em esteira por quatro dias consecutivos, os animais foram submetidos a uma corrida em esteira à velocidade de 20 m/min durante 50 minutos, sendo que a partir deste momento, a velocidade foi corrigida em 1 m/min até a exaustão. Os estoques de glicogênio intramuscular sofreram depleção estatisticamente significativa (Rosa Neto, Lira *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram uma depleção similar de glicogênio intramuscular, mesmo com a utilização de intensidades inferiores à empregada nos estudos com os quais estabelecemos a comparação.

ANÁLISE DA DENSIDADE ÓTICA

Por meio da histoquímica ATPase, foi possível identificar os diferentes tipos de fibras musculares (basicamente, tipos I e II) e assim, avaliar a densidade ótica do glicogênio intramuscular por tipo de fibra. A depleção do glicogênio intramuscular observada nos grupos SE e TE coincidiu com a exaustão e foi predominante nas fibras musculares do tipo I em ambos os grupos SE e TE ($p < 0,001$). No entanto, o grupo SE apresentou ainda, depleção significativa também em fibras do tipo II ($p < 0,05$). Embora tanto a velocidade relativa quanto o tempo até a exaustão tenham sido menores no grupo SE, o estresse metabólico foi nitidamente maior, uma vez que para suportar um esforço relativo proporcional àquele empreendido pelo grupo TE, o grupo SE mobilizou fibras musculares do tipo II.

O melhor desempenho observado no grupo TE pode estar relacionado a vários fatores como uma melhora da economia de corrida. Embora não tenhamos medido esta variável, alguns estudos descreveram este benefício, após períodos de treinamento de endurance muito menores do que o período empreendido em nosso estudo (Musch, Moore *et al.*, 1989; Fitzsimons, Bodell *et al.*, 1990).

A identificação dos diferentes tipos de fibras musculares se deu pela diferenciação daquelas que apresentaram imuno-positividade ao anti-corpo para miosina de cadeia pesada do tipo lenta (característica das fibras do tipo I). Vários estudos têm demonstrado que o treinamento de endurance provoca mudanças fenotípicas como o aumento da expressão gênica e protéica de MHCs em todos os tipos de fibras (Bigard, Janmot *et al.*, 1996; O'Neill, Zheng *et al.*, 1999; Baldwin e Haddad, 2001; Cornachione, Caçõ-Benedini *et al.*, 2010). Devemos levar em consideração que isto não significa necessariamente, que toda a atividade metabólica também sofrerá alterações (metabolismo glicolítico para metabolismo oxidativo) de grau semelhante e ao mesmo tempo.

Ao compararmos as imagens de imunoistoquímica com aquelas coradas histoquimicamente com PAS, não encontramos uma relação tão favorável quanto àquela obtida a partir das imagens de histoquímica ATPase. Portanto, o parâmetro de identificação de subtipos de fibras musculares para a análise da densidade ótica, foi a histoquímica ATPase.

Uma vez que o tipo de estímulo empregado em nosso estudo foi predominantemente aeróbio, já era esperado que a depleção do glicogênio intramuscular fosse muito mais significativa nas fibras do tipo I. Embora a análise bioquímica do glicogênio muscular ofereça maior objetividade, é

impossível determinar a quantidade de glicogênio por tipo de fibra muscular por este método isoladamente. A análise da densidade ótica possibilita estimar com certo grau de precisão esta diferença.

Em um estudo realizado por Yoshimura e colaboradores, foi investigado o padrão de recrutamento de fibras intrafusais dos músculos sóleo e extensor *digitorum longus* de ratos treinados, após exercício de alta intensidade e curta duração. Vale a pena resaltar que a metodologia empregada por Yoshimura e colaboradores foi similar a realizada em nosso trabalho, ou seja, estabelecer a relação entre a medida do glicogênio bioquímico e histoquímico. Contudo tomamos o cuidado de utilizar um controle positivo para a análise histoquímica para PAS, uma vez que a histoquímica para PAS não marca apenas glicogênio. Yoshimura e colaboradores observaram que o exercício de alta intensidade promoveu depleção das reservas de glicogênio intramuscular nas fibras do tipo II, quando comparadas às fibras do tipo I (Yoshimura, Toyoda *et al.*, 2005). No presente estudo, procuramos estabelecer a relação de causa e efeito entre as mesmas variáveis após exercício de ultra endurance até a exaustão, com o intuito de validar a análise da densidade ótica. O coeficiente de determinação foi “ $r^2_{ajustado} = 0,83$ ” ($p < 0,001$), isto significa que o comportamento do glicogênio medido pela análise da densidade ótica é similar ao glicogênio medido bioquimicamente em 83%. No entanto, a regressão não foi simples e sim múltipla (gráficos 7 e 8), uma vez que a diferença de tratamento entre grupos foi muito grande (treinar ou não treinar/ exaustão ou não exaustão). Vários modelos de regressão foram testados, porém o que melhor explicou a variação do glicogênio muscular medido bioquimicamente (transformado em Logaritmo) foi a regressão múltipla, tendo

como variáveis independentes a densidade ótica e o Fator Treinamento, onde todos os coeficientes obtidos foram estatisticamente significantes ($P < 0,001$).

ADAPTAÇÕES INDUZIDAS PELO TREINAMENTO

A diferença observada na depleção do glicogênio intramuscular entre os grupos SE e TE foi ocasionada pelo treinamento.

Vários estudos descrevem melhora da atividade oxidativa induzida pelo treinamento de endurance (Holloszy, 1967; Holloszy, Oscai *et al.*, 1970; Arida, Scorza *et al.*, 1999; Wisløff, Helgerud *et al.*, 2001; Huang, Chang *et al.*, 2008). Esta melhora é ocasionada pelo aumento da densidade capilar (Laughlin e Roseguini, 2008), aumento da densidade mitocondrial (Wright, Han *et al.*, 2007), aumento da concentração de enzimas que participam do metabolismo oxidativo como a piruvato desidrogenase quinase (PDK4), citrato sintase (CS), Acetil coA carboxilase β (ACCP), proteína ligante de ácidos graxos (FABP), lipoproteína lipase (LPL) entre outras (Murakami, Shimomura *et al.*, 1995; Spina, Chi *et al.*, 1996; Jones, Baar *et al.*, 2003; Huang, Chang *et al.*, 2008; Narkar, Downes *et al.*, 2008), o que de fato, justifica uma melhora significativa no metabolismo energético como um todo.

A interpretação dos resultados ganha maior clareza se observarmos algumas variáveis em conjunto. Ao analisarmos o comportamento do glicogênio hepático (gráfico 7) podemos observar que o treinamento propiciou um aumento significativo das suas reservas ($p < 0,05$). O grupo TE apresentou uma depleção significativa das reservas de glicogênio hepático ao final do exercício exaustivo. Parece que o treinamento influenciou tanto a capacidade hepática de síntese de glicogênio quanto a capacidade de degradação. Já é conhecido que a glicogenólise hepática é evidenciada à medida que o

exercício se prolonga, com o intuito de sustentar os níveis glicêmicos (Kjaer, 1998). No presente estudo, o tempo decorrido até a exaustão foi em média de 180 minutos para o grupo TE. Estudos com a metade do tempo evidenciaram quedas consideráveis nas reservas de glicogênio hepático (Jamurtas, Goldfarb *et al.*, 2001). A queda do glicogênio hepático foi possivelmente atenuada pela contribuição da gliconeogênese. Mediada pelo hormônio glucagon, a gliconeogênese contribui significativamente para a produção de glicose hepática durante o exercício prolongado (Kjaer, 1998). Quando o exercício é de curta duração e intensidade moderada, há uma contribuição pequena (5 a 15%) da gliconeogênese hepática para a glicemia (Wasserman, Williams *et al.*, 1988). Porém esta contribuição sobe para 20 a 25% quando o exercício é desempenhado durante um período prolongado (Wasserman, Spalding, Bracy *et al.*, 1989; Wasserman, Spalding, Lacy *et al.*, 1989). A glicemia (tabela 2) diminuiu significativamente no grupo TE. Considerando que não houve alteração significativa destes parâmetros no grupo SE, podemos sugerir que o treinamento de endurance aprimorou a capacidade de captação da glicose plasmática pelos tecidos durante o exercício. Alguns estudos descreveram um aumento significativo das concentrações de GLUT 4 no músculo esquelético, com consequente aumento na capacidade de captação de glicose (Brozinick, Mccoid *et al.*, 1997; Reynolds, Brozinick *et al.*, 1997). Durante o exercício, a captação de glicose pelas células também é mediada pelo GLUT 4. Porém, o estímulo não parte da insulina, mas da AMPK (Kristiansen, Gade *et al.*, 2000; Wojtaszewski, Nielsen *et al.*, 2000; Richter, E., Wojtaszewski, J. *et al.*, 2001; Wojtaszewski, Jørgensen *et al.*, 2002; Jørgensen, Richter *et al.*, 2006; Jørgensen, Treebak *et al.*, 2007).

AMPK

Em nosso estudo, ficou evidente que o treinamento e o exercício de ultra endurance até a exaustão afetaram de forma significativa a expressão protéica de AMPK.

Os efeitos do exercício de endurance sobre a expressão protéica e gênica da proteína AMPK já foram investigados por outros autores (Winder, Taylor *et al.*, 2006). No entanto, nenhum estudo verificou os efeitos do treinamento em longo prazo (12 semanas) sobre tais variáveis em ratos.

Outra característica, que atribuiu originalidade a este estudo foi o exercício de ultra endurance levado até a exaustão. Sob a intensidade de 60% da Vmax, os animais suportaram o exercício por um tempo extremamente prolongado, vindo a fadigar por incapacidade de manter o ritmo de corrida.

A exaustão coincidiu com uma depleção intensa das reservas de glicogênio muscular em ambos os grupos SE e TE. Porém, apenas os grupos T e TE apresentaram elevação significativa da expressão protéica da AMPK, Isto nos leva a sugerir que o fator “treinamento” foi determinante no aumento da sua expressão.

A ativação da proteína AMPK depende basicamente de um aumento na razão AMP:ATP e da depleção do glicogênio muscular. O glicogênio gera uma inibição direta sobre a AMPK. Quando o glicogênio apresenta níveis elevados, algumas cadeias de glicogênio se ligam à AMPK, mais precisamente no domínio de ligação ao glicogênio *glycogen binding domain (GBD)* presente na subunidade β da AMPK, inibindo-a (Mcbride, Ghilagaber *et al.*, 2009).

O exercício exaustivo isoladamente não afetou a expressão protéica da AMPK (grupo SE). Porém, a exaustão exerceu uma influência significativa quando somada ao treinamento (grupo TE).

O fato da expressão da AMPK ter aumentado no grupo TE em decorrência do exercício exaustivo e não no grupo SE, nos leva a pensar que o treinamento promoveu uma melhora do mecanismo envolvido na transcrição protéica, possibilitando o aumento da quantidade de proteína AMPK observado em TE. Em outras palavras, o treinamento propiciou condições para que as respostas moleculares de transcrição se tornassem mais eficientes, mesmo que agudamente (após a exaustão). O que justifica o aumento significativo da expressão protéica no grupo TE quando comparado ao grupo T. Por exemplo, McGee e colaboradores descreveram que uma única sessão de exercício foi capaz de promover um aumento significativo nas concentrações nucleares de AMPK $\alpha 2$, sem aumento concomitante da sua expressão protéica (Mcgee, Howlett *et al.*, 2003).

Estudos *in vitro* revelaram que diferentes tipos de estresse (químicos) aumentaram a transcrição da AMPK (Bungard, Fuerth *et al.*, 2010).

Ao analisarmos a expressão de RNA mensageiro da AMPK em nosso estudo, é possível notar que tanto o treinamento quanto a exaustão afetaram-na negativamente. Porém, este efeito negativo sobre a expressão de RNA mensageiro desaparece quando se somam os fatores treinamento e exaustão (grupo TE). Para compreender melhor estes resultados, deve-se analisar a forma como cada fator (treinamento/exaustão) afetou a sinalização molecular. Considerando que o fator treinamento influenciou cronicamente a expressão de RNA mensageiro, podemos pensar que a capacidade de transcrição foi aumentada, visto que a expressão protéica foi significativamente maior nos grupos treinados T e TE.

O fator exaustão exerceu um efeito agudo sobre a expressão de RNA mensageiro dos grupos SE e TE. A possível causa do exercício exaustivo ter

exercido efeito negativo sobre a expressão de RNA do grupo SE e, ao mesmo tempo, um efeito positivo no grupo TE, se deve provavelmente às adaptações nas sinalizações celulares e moleculares induzidas pelo treinamento. Uma delas é a diferença na velocidade com a qual ocorre a depleção do glicogênio muscular em ambos os grupos SE e TE. O treinamento aumentou as concentrações hepáticas de glicogênio (grupo T) e aprimorou o mecanismo de captação de glicose (haja vista a significativa depleção da glicemia plasmática observada no grupo TE). Somado a isto, deve-se considerar ainda que uma provável melhora na resposta do metabolismo oxidativo direciona para um mecanismo poupador das reservas de glicogênio muscular.

A captação de glicose durante o exercício depende diretamente do aumento na translocação do GLUT4 para a superfície da membrana das células musculares. Segundo a cinética de *Michelis-Menten*, o exercício aumenta a V_{max} do transporte de glicose, sem afetar o K_m (constante de afinidade), o que sugere que o transporte de glicose depende muito mais do número de transportadores (GLUT4) do que da afinidade da glicose ao seu transportador (King, P., Hirshman, M. *et al.*, 1989; Sternlicht, E., Barnard, R. *et al.*, 1989; Zinker, Lacy *et al.*, 1993).

A proteína AMPK tem sido relacionada ao aumento da expressão de GLUT4 no músculo esquelético (Holmes, Kurth-Kraczek *et al.*, 1999; Holmes, Sparling *et al.*, 2005). Quando ativada, a AMPK fosforila GEF (*GLUT4 enhancing factor*) um fator de transcrição promotor do GLUT4 que aumenta a sua taxa de transcrição, o que resulta portanto, num aumento das concentrações de GLUT4 e consequentemente num aumento da captação de glicose durante o exercício (Kristiansen, Gade *et al.*, 2000).

A AMPK está relacionada a uma série de sinalizações moleculares que conduzem para uma adaptação ao treinamento de endurance, tais como *peroxisome proliferator-activated receptor 1 coactivator α* (PGC-1 α), *Nuclear respiratory fator 1 e 2* (NRF-1 e NRF-2), *PPAR α e PPAR γ* e *Mitochondrial transcription factor A* (Tfam) (Winder, Holmes *et al.*, 2000; Bergeron, Ren *et al.*, 2001; Mcgee e Hargreaves, 2010). A ativação da AMPK induzida quimicamente por AICAR, uma substância que mimetiza o efeito da contração muscular sobre a AMPK, resultou num significativo aumento de (PGC-1 α) (Irrcher, Adhihetty, Joseph *et al.*, 2003; Irrcher, Adhihetty, Sheehan *et al.*, 2003).

Estas alterações moleculares, até então listadas, corroboram com os resultados observados em nosso estudo quanto ao desempenho do grupo TE comparado a SE. Considerando a quantidade de trabalho produzida por ambos os grupos ao final do exercício de ultra endurance até a exaustão, pode-se observar que o grupo TE foi muito mais eficiente que o grupo SE.

Diante das circunstâncias, o ritmo com o qual ocorreu a depleção das reservas de glicogênio muscular deve ter sido muito menor, considerando que o tempo até atingir a exaustão foi significativamente maior para TE.

O grupo SE não dispunha deste aprimoramento metabólico, uma vez que não foi submetido ao treinamento, necessitando recorrer mais intensamente às reservas de glicogênio muscular, promovendo a sua depleção num espaço de tempo significativamente menor quando comparado a TE.

A variação nas reservas de energia tem sido descritas como potencialmente inibitórias para a sinalização de transcrição protéica (Chan, Soltys *et al.*, 2004). Embora não tenhamos nenhum marcador molecular que

possa comprovar esta teoria, este parece ser o motivo mais provável para o comportamento da expressão de RNA mensageiro da proteína AMPK.

mTOR

Um dos principais estímulos produzidos após o exercício é a ativação da síntese protéica. Esta, por sua vez é sinalizada por uma proteína chave chamada *mammalian target of rapamycin* (mTOR) (Jacinto e Hall, 2003). Recentemente tem sido estabelecida uma relação entre a proteína AMPK e a proteína mTOR. A sinalização da mTOR é inibida sob condições de baixos níveis de nutrientes como glicose, glicogênio, aminoácidos bem como baixos níveis de ATP intracelular (Shamji, Nghiem *et al.*, 2003). Esta inibição ocorre mediante a ativação da AMPK, impedindo atividades celulares com gasto energético elevado como a “transcrição” durante a síntese protéica (McLeod e Proud, 2002; Ma e Blenis, 2009). Optamos por verificar também a expressão da proteína mTOR em nosso estudo, uma vez que esta apresenta um comportamento antagônico ao da proteína AMPK, o que poderia ser útil para a análise dos resultados.

Não houve diferença significativa na expressão gênica da mTOR entre grupos. Estudos têm descrito uma inibição da AMPK sobre a transcrição de RNA mensageiro da via da mTOR (Jørgensen, Richter *et al.*, 2006; Jørgensen, Jensen *et al.*, 2007; Jørgensen e Rose, 2008). Já, a expressão protéica da mTOR apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em função da exaustão (grupos SE e TE), sendo que houve efeito somatório ao treinamento no grupo TE, notado em função da interação significativa entre os dois fatores ($p < 0,05$). Embora a expressão de RNA mensageiro da mTOR não tenha apresentado alteração significativa, pode-se observar uma discreta tendência dos dados a uma diminuição da expressão de RNA dos grupos SE e TE, comportamento

este, contrário ao da expressão protéica, onde SE e TE apresentaram aumento significativo.

Os argumentos que justificam esta resposta na expressão protéica são muito similares àqueles empregados na discussão dos resultados da AMPK. No entanto, a proteína mTOR sofre inibição à medida que a depleção das reservas de energia se torna evidente (Shamji, Nghiem *et al.*, 2003).

Outra consideração importante, se deve ao fato da mTOR ser ativada por uma proteína da via da insulina (PKB ou AKT), ou seja, mediante estímulo insulínico (Reynolds, Bodine *et al.*, 2002). Como já se sabe, o exercício promove um efeito inibitório sobre a secreção de insulina à medida que a intensidade ou o tempo se prolongam (Houwing, Fränkel *et al.*, 1995). Embora a expressão protéica da mTOR tenha aumentado em função da exaustão, é pouco provável que também tenha aumentado sua atividade neste período, uma vez que esta apresenta um comportamento antagônico ao da AMPK.

Alguns estudos têm demonstrado que a síntese protéica é um dos processos que mais consomem energia em células eucarióticas (Chan, Soltys *et al.*, 2004; Ma e Blenis, 2009). Vários estudos descrevem uma inibição direta produzida pela ativação da AMPK mediante a depleção das reservas de energia durante o exercício, uma vez que a mTOR é uma enzima chave na sinalização para a síntese protéica (Atherton, Babraj *et al.*, 2005; Reiter, Bolster *et al.*, 2005; Kudchodkar, Del Prete *et al.*, 2007). O comportamento de expressão protéica da mTOR apresentou-se contrário às nossas expectativas, estando aumentado nos grupos SE e TE. Talvez o exercício exaustivo possa ter influenciado de alguma maneira este comportamento, o que para nós, ainda não está claro.

O treinamento, embora de intensidade moderada, pode ter melhorado a sensibilidade com que a mTOR é expressa, produzindo o efeito somatório com a exaustão no grupo TE. Em um estudo realizado por Reynolds e colaboradores, foi investigado o efeito do exercício aeróbico voluntário em roda sobre as vias de sinalização da proteína PKB e da mTOR em camundongos idosos. A expressão protéica da mTOR aumentou 65% enquanto que a expressão da proteína PKB aumentou 50%, demonstrando que estímulos moderados também ativam as vias de síntese protéica (Reynolds, Reid *et al.*, 2004).

LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS

No decorrer do presente estudo, sofremos algumas limitações metodológicas que nos impediram de realizar três medidas que julgamos ser importantes para respondermos a todas as perguntas referentes ao objetivo do trabalho.

Enquanto aguardávamos pela chegada do anti-corpo *AMPKphospho thr172*, sofremos o descongelamento de nosso freezer -80°, com consequente perda das amostras, o que inviabilizou a medida da AMPK em seu estado fosforilado. A alternativa seria iniciar o treino de novos animais para então reavaliarmos todos os parâmetros, uma vez que não poderíamos estabelecer qualquer correlação proveniente de animais diferentes. Já não dispunhamos de mais tempo para reiniciarmos o estudo e optamos por medir a atividade da AMPK num estudo futuro.

Julgamos que esta opção não invalida o estudo já que o modelo de treinamento é inovador e trouxe resultados significativos acerca da expressão de RNA, bem como da expressão protéica da AMPK.

Outra dificuldade pela qual passamos, foi a medida de cinética enzimática da enzima Citrato Sintase. A atividade da enzima citrato sintase (CS) é determinada a partir da reação da enzima com o substrato formado pela combinação do oxalacetato com o acetil CoA. Para tanto, o equipamento precisa ser ajustado para aumentar a temperatura para 37°C, que é a temperatura de melhor desempenho da enzima. A atividade é medida numa absorbância de 412 nm por 3 minutos com incubação de 7 minutos com os substratos.

Nosso espectrofotômetro não ajustou a temperatura. Quando notamos o problema, imediatamente colocamos as amostras restantes em nitrogênio

líquido, com o intuito de realizar uma segunda tentativa noutro espectrofotômetro.

Lamentavelmente, quando realizamos a segunda tentativa foi possível constatar por meio da comparação com valores obtidos por outros estudos (Delp e Duan, 1996; Siu, Donley *et al.*, 2003; Pimenta, Lambertucci *et al.*, 2007), que a maior parte da atividade enzimática já havia sido perdida. Por esta razão, optamos por não considerar os resultados, uma vez que os valores não refletiriam a realidade.

A medida do consumo máximo de oxigênio ($\dot{V}\text{O}_2$ Máximo) não foi possível, pois não dispunhamos do equipamento necessário em nosso laboratório. O estresse em função do deslocamento ao qual nossos animais seriam submetidos, no caso de deslocá-los até outro centro que possuísse os equipamentos necessários, tornou inválida a iniciativa.

Outro fator que pesou a favor de não realizarmos a medida do $\dot{V}\text{O}_2$ Máximo, foi a correlação desta medida com a medida da velocidade máxima obtida em teste incremental. (V_{max}), medida esta que realizamos ao longo de todo o estudo, com o intuito de estabelecermos as intensidades relativas de esforço (Aoki, Belmonte *et al.*, 2003).

Resumidamente o exercício de ultra endurance levado até a exaustão depletou o glicogênio intramuscular e provocou um aumento da expressão protéica e gênica da proteína AMPK em animais treinados e submetidos a exercício de ultra endurance. Mais estudos são necessários com o intuito de verificar os efeitos do exercício de ultra endurance sobre a atividade da proteína AMPK, bem como da proteína mTOR.

FUTURAS INVESTIGAÇÕES

Verificar o efeito do exercício de ultra endurance sobre a atividade da proteína AMPK em seu estado fosforilado, bem como a sua influência sobre o transportador de glicose (GLUT-4) e seu fator de crescimento (*GEF*).

Verificar a influência da proteína AMPK sobre a proteína Acetil CoA Carboxilase (ACC) sob as mesmas condições mencionadas acima.

Verificar a influência da AMPK em seu estado fosforilado sobre a proteína mTOR.após o exercício exaustivo.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos em nosso estudo, foi possível concluir que o exercício de ultra endurance levado até a exaustão depleta o glicogênio intramuscular.

Após a análise do desempenho apresentado pelos grupos TE e SE, foi possível concluir que o treinamento foi o fator determinante na diferença de desempenho entre os grupos.

As fibras do tipo I são as que apresentam maior depleção de glicogênio quando o exercício é de ultra endurance.

Os ajustes metabólicos decorrentes do treinamento são melhor percebidos em TE.

Tais ajustes são:

- ✓ Sobre as reservas de glicogênio hepático;
- ✓ Quanto a sua disponibilidade durante o exercício;
- ✓ Pela maior captação de glicose plasmática;
- ✓ Pelo aumento da expressão da proteína AMPK.

ANEXOS

ANEXO 1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 11 de janeiro de 2008.

CEP 2031/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) VICTOR ALEXANDRE FERREIRA TARINI

Co-Investigadores: Flavio Faloppa; Aparecida Emiko Hirata; Ricardo Mario Arida; Beny Schmidt

Disciplina/Departamento: Ortopedia e Traumatologia da Universidade Federal de São

Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos do exercício de ultraendurance sobre as reservas de glicogênio intramuscular e a expressão da proteína AMPK em ratos treinados”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo experimental crônico em ratos wistar.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: não se aplica.

OBJETIVOS: Determinar os efeitos do exercício de ultraendurance sobre as reservas de glicogênio intramuscular e sobre a expressão da proteína AMPK no músculo de ratos treinados quando privados de reposição calórica durante o esforço físico.

RESUMO: Serão utilizados ratos machos albinos da raça wistar, adultos, pesando entre 200 e 280 g, provenientes do CEDEME da Unifesp. Os objetivos específicos: determinar se o exercício de ultraendurance depleta os estoques de glicogênio intramuscular quando realizado sem qualquer reposição calórica durante o exercício; estimar o glicogênio remanescente por meio da análise histoquímica, da densidade ótica e pela quantificação do glicogênio intramuscular por meio da análise bioquímica; quantificar a proteína AMPK em seu estado fosforilado por meio da técnica immunoblotting e sua expressão gênica por meio de RT-PCR. Quando comparados os diferentes tratamentos em cada ponto temporal, será utilizado a análise de variância (ANOVA) utilizando Bonferroni como pós-teste, sempre que alguma diferença for detectada. Os resultados serão expressos em média e erro padrão da média. Para análise de fosforilação será utilizado o teste t de Student não pareado.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Descrever o que ocorre de fato com os estoques de glicogênio intramuscular quando nos exercitamos por períodos extremamente prolongados sem qualquer reposição calórica.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos que serão realizados.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **10/1/2009 e 10/1/2010.**

Rua Botucatu, 572 - 1º andar – conj. 14 - CEP 04023-062 - São Paulo / Brasil

Tel.: (011) 5571-1062 - 5539.7162

ANEXO 2. ARTIGOS EM FASE FINAL DE ELABORAÇÃO PARA SEREM SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO:

1. TARINI, VAF¹, CARNEVALI Jr³, LC, ARIDA, RM², CUNHA, CA², SEELEANDER, M³, SCHMIDT, B¹, FALOPPA, F¹. “The exhaustion induced by ultra endurance exercise increases both ampk and mTOR protein expression in trained rats”.

2. TARINI, VAF¹, CARNEVALI Jr³, LC, ARIDA, RM², CUNHA, CA², SEELEANDER, M³, SCHMIDT, B¹, FALOPPA, F¹. Seletive fibre type glycogen depletion in trained rats during ultra endurance exercise until exhaustion and the relationship with AMPK protein expression.

ANEXO 3. ARTIGO PUBLICADO EM COLABORAÇÃO AO LONGO DO ESTUDO.

1. [Lira FS](#), [Rosa JC](#), [Pimentel GD](#), [Tarini VA](#), [Arida RM](#), [Faloppa F](#), [Alves ES](#), [do Nascimento CO](#), [Oyama LM](#), [Seelaender M](#), [de Mello MT](#), [Santos RV](#). "Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats". [Lipids Health Dis](#). 2010 Oct 4;9:109.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J. *et al.* Intrasteric control of AMPK via the gamma1 subunit AMP allosteric regulatory site. *Protein Sci* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 155-65, Jan 2004.

AHLBORG, G. *et al.* Substrate turnover during prolonged exercise in man. Splanchnic and leg metabolism of glucose, free fatty acids, and amino acids. *J Clin Invest* [S.I.], v. 53, n. 4, p. 1080-90, Apr 1974.

ANDERSEN, P.; SALTIN, B. Maximal perfusion of skeletal muscle in man. *J Physiol* [S.I.], v. 366, p. 233-49, Sep 1985.

AOKI, M. S. *et al.* Influência da suplementação lipídica sobre a indução do efeito poupador de glicogênio em ratos submetidos ao exercício de “endurance”. *Rev. paul. Educ. Fís., São Paulo* [S.I.], v. 17, n. (2), p. 93-103, 2003.

ARIDA, R. *et al.* Effect of physical exercise on seizure occurrence in a model of temporal lobe epilepsy in rats. *Epilepsy Res* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 45-52, Oct 1999.

ATHERTON, P. J. *et al.* Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* [S.I.], v. 19, n. 7, p. 786-8, May 2005.

BALDWIN, K.; HADDAD, F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 90, n. 1, p. 345-57, Jan 2001.

BAUMANN, C. A. *et al.* CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* [S.I.], v. 407, n. 6801, p. 202-7, Sep 14 2000.

BERGERON, R. *et al.* Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 281, n. 6, p. E1340-6, Dec 2001.

BIGARD, X. *et al.* Endurance training affects myosin heavy chain phenotype in regenerating fast-twitch muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 81, n. 6, p. 2658-65, Dec 1996.

BROZINICK, J. T. *et al.* Regulation of cell surface GLUT4 in skeletal muscle of transgenic mice. *Biochem J* [S.I.], v. 321 (Pt 1), p. 75-81, Jan 1997.

BUNGARD, D. *et al.* Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription via histone H2B phosphorylation. *Science* [S.I.], v. 329, n. 5996, p. 1201-5, Sep 2010.

BÁRÁNY, M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* [S.I.], v. 50, n. 6, p. Suppl:197-218, Jul 1967.

CARVALHEIRA, J. B. C. *et al.* Via de sinalização da insulina. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* [S.I.], v. 46, p. 419-425, 04/08 2002.

CHAN, A. Y. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase inhibits protein synthesis associated with hypertrophy in the cardiac myocyte. *J Biol Chem* [S.I.], v. 279, n. 31, p. 32771-9, Jul 2004.

CHANG, L. *et al.* Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med* [S.I.], v. 10, n. 7-12, p. 65-71, Jul-Dec 2004.

CHEUNG, P. *et al.* Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* [S.I.], v. 346 Pt 3, p. 659-69, Mar 2000.

CHIANG, S. H. *et al.* Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* [S.I.], v. 410, n. 6831, p. 944-8, Apr 19 2001.

CLIFFORD, P. S.; HELLSTEN, Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 97, n. 1, p. 393-403, Jul 2004.

CODERRE, L. *et al.* Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. *J Biol Chem* [S.I.], v. 270, n. 46, p. 27584-8, Nov 17 1995.

CORNACHIONE, A. *et al.* Effects of eccentric and concentric training on capillarization and myosin heavy chain contents in rat skeletal muscles after hindlimb suspension. *Acta Histochem* [S.I.], Feb 2010.

CORTON, J. *et al.* Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response. *Curr Biol* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 315-24, Apr 1994.

CUATRECASAS, P. The insulin receptor. *Diabetes* [S.I.], v. 21, n. 2 Suppl, p. 396-402, 1972.

CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* [S.I.], v. 274, n. 4, p. 1865-8, Jan 22 1999.

DELP, M. D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 80, n. 1, p. 261-70, Jan 1996.

DISHMAN, R. *et al.* Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiol Behav* [S.I.], v. 43, n. 5, p. 541-6, 1988.

DOUEN, A. G. *et al.* Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem* [S.I.], v. 265, n. 23, p. 13427-30, Aug 15 1990.

DURANTE, P. *et al.* Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 283, n. 1, p. E178-86, Jul 2002.

FAIRCHILD, T. J. *et al.* Glycogen synthesis in muscle fibers during active recovery from intense exercise. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], v. 35, n. 4, p. 595-602, Apr 2003.

FAIRCHILD, T. J.; FOURNIER, P. A. Glycogen determination using periodic acid-schiff: artifact of muscle preparation. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], v. 36, n. 12, p. 2053-8, Dec 2004.

FITZSIMONS, D. *et al.* Effect of thyroid state on cardiac myosin P-light chain phosphorylation during exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 313-20, Jul 1990.

FOLLI, F. *et al.* Insulin stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity and association with insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of the intact rat. *J Biol Chem* [S.I.], v. 267, n. 31, p. 22171-7, Nov 5 1992.

FRAYN, K. N. The glucose-fatty acid cycle: a physiological perspective. *Biochem Soc Trans* [S.I.], v. 31, n. Pt 6, p. 1115-9, Dec 2003.

FREYCHET, P. *et al.* Insulin receptors in the liver: specific binding of (125 I)insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 68, n. 8, p. 1833-7, Aug 1971.

FUJII, N. *et al.* Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* [S.I.], v. 63, n. 2, p. 205-10, May 2004.

_____. Regulation of glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Proc Nutr Soc* [S.I.], v. 63, n. 2, p. 205-10, May 2004.

GOULD, G. W.; HOLMAN, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J* [S.I.], v. 295 (Pt 2), p. 329-41, Oct 15 1993.

GUNDERSON, H. *et al.* Exercise and exhaustion effects on glycogen synthesis pathways. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 81, n. 5, p. 2020-6, Nov 1996.

HANSEN, P. *et al.* Kinetics of 2-deoxyglucose transport in skeletal muscle: effects of insulin and contractions. *Am J Physiol* [S.I.], v. 268, n. 1 Pt 1, p. C30-5, Jan 1995.

HAWLEY, S. *et al.* Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* [S.I.], v. 271, n. 44, p. 27879-87, Nov 1996.

HOLLOSZY, J. Biochemical adaptations in muscle. Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J Biol Chem* [S.I.], v. 242, n. 9, p. 2278-82, May 1967.

HOLLOSZY, J. *et al.* Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 40, n. 6, p. 1368-73, Sep 1970.

HOLMES, B. *et al.* Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT-4, hexokinase, and glycogen in muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 87, n. 5, p. 1990-5, Nov 1999.

HOLMES, B. F. *et al.* Regulation of muscle GLUT4 enhancer factor and myocyte enhancer factor 2 by AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 289, n. 6, p. E1071-6, Dec 2005.

HOUWING, H. *et al.* Role of the sympathoadrenal system in exercise-induced inhibition of insulin secretion. Effects of islet transplantation. *Diabetes* [S.I.], v. 44, n. 5, p. 565-71, May 1995.

HUANG, T. *et al.* Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *J Bone Miner Metab* [S.I.], v. 26, n. 4, p. 350-7, 2008.

IHLEMANN, J. *et al.* Calphostin C is an inhibitor of contraction, but not insulin-stimulated glucose transport, in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* [S.I.], v. 167, n. 1, p. 69-75, Sep 1999.

IRRCHEER, I. *et al.* Regulation of mitochondrial biogenesis in muscle by endurance exercise. *Sports Med* [S.I.], v. 33, n. 11, p. 783-93, 2003.

_____. PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am J Physiol Cell Physiol* [S.I.], v. 284, n. 6, p. C1669-77, Jun 2003.

JACINTO, E.; HALL, M. N. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 4, n. 2, p. 117-26, Feb 2003.

JAMURTAS, A. *et al.* Beta-endorphin infusion during exercise in rats does not alter hepatic or muscle glycogen. *J Sports Sci* [S.I.], v. 19, n. 12, p. 931-5, Dec 2001.

JEUKENDRUP, A. E. *et al.* Exogenous glucose oxidation during exercise in endurance-trained and untrained subjects. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 82, n. 3, p. 835-40, Mar 1997.

JONES, T. *et al.* Exercise induces an increase in muscle UCP3 as a component of the increase in mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 284, n. 1, p. E96-101, Jan 2003.

JORGENSEN, S.; ROSE, A. How is AMPK activity regulated in skeletal muscles during exercise? *Front Biosci* [S.I.], v. 13, p. 5589-604, 2008.

JØRGENSEN, S. B. *et al.* Role of AMPK in skeletal muscle gene adaptation in relation to exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* [S.I.], v. 32, n. 5, p. 904-11, Oct 2007.

_____. Role of AMPK in skeletal muscle metabolic regulation and adaptation in relation to exercise. *J Physiol* [S.I.], v. 574, n. Pt 1, p. 17-31, Jul 2006.

_____. Role of AMPKalpha2 in basal, training-, and AICAR-induced GLUT4, hexokinase II, and mitochondrial protein expression in mouse muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 292, n. 1, p. E331-9, Jan 2007.

KAHN, C. R. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med* [S.I.], v. 36, p. 429-51, 1985.

KING, P. *et al.* Glucose transport in skeletal muscle membrane vesicles from control and exercised rats. *Am J Physiol* [S.I.], v. 257, n. 6 Pt 1, p. C1128-34, Dec 1989.

KING, P. A. *et al.* Glucose transport in skeletal muscle membrane vesicles from control and exercised rats. *Am J Physiol* [S.I.], v. 257, n. 6 Pt 1, p. C1128-34, Dec 1989.

KJAER, M. Hepatic glucose production during exercise. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 441, p. 117-27, 1998.

KRISTIANSEN, S. *et al.* Glucose uptake is increased in trained vs. untrained muscle during heavy exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 89, n. 3, p. 1151-8, Sep 2000.

KUDCHODKAR, S. B. *et al.* AMPK-mediated inhibition of mTOR kinase is circumvented during immediate-early times of human cytomegalovirus infection. *J Virol* [S.I.], v. 81, n. 7, p. 3649-51, Apr 2007.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [S.I.], v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LAUGHLIN, M.; ROSEGUINI, B. Mechanisms for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. *J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 59 Suppl 7, p. 71-88, Dec 2008.

LEE, A. D. *et al.* Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett* [S.I.], v. 361, n. 1, p. 51-4, Mar 13 1995.

LEE, W. *et al.* AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPARalpha and PGC-1. *Biochem Biophys Res Commun* [S.I.], v. 340, n. 1, p. 291-5, Feb 2006.

LEMIEUX, K. *et al.* The transferrin receptor defines two distinct contraction-responsive GLUT4 vesicle populations in skeletal muscle. *Diabetes* [S.I.], v. 49, n. 2, p. 183-9, Feb 2000.

LUND, S. *et al.* Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 92, n. 13, p. 5817-21, Jun 20 1995.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* [S.I.], v. 10, n. 5, p. 307-18, May 2009.

MARCHAND, I. *et al.* Quantification of subcellular glycogen in resting human muscle: granule size, number, and location. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 93, n. 5, p. 1598-607, Nov 2002.

MCBRIDE, A. *et al.* The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 23-34, Jan 2009.

MCGEE, S. L.; HARGREAVES, M. AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)* [S.I.], v. 118, n. 8, p. 507-18, Apr 2010.

MCGEE, S. L. *et al.* Exercise increases nuclear AMPK alpha2 in human skeletal muscle. *Diabetes* [S.I.], v. 52, n. 4, p. 926-8, Apr 2003.

MCLEOD, L. E.; PROUD, C. G. ATP depletion increases phosphorylation of elongation factor eEF2 in adult cardiomyocytes independently of inhibition of mTOR signalling. *FEBS Lett* [S.I.], v. 531, n. 3, p. 448-52, Nov 2002.

MELTON, S. *et al.* L-carnitine supplementation does not promote weight loss in ovariectomized rats despite endurance exercise. *Int J Vitam Nutr Res* [S.I.], v. 75, n. 2, p. 156-60, Mar 2005.

MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z* [S.I.], v. 49, p. 333-369, 1913.

MURAKAMI, T. *et al.* Differential adaptation to endurance training between heart and gastrocnemius muscle mitochondria in rats. *Biochem Mol Biol Int* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 285-90, Jun 1995.

MUSCH, T. *et al.* Cardiac adaptations to endurance training in rats with a chronic myocardial infarction. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 66, n. 2, p. 712-9, Feb 1989.

MUSI, N. *et al.* AMP-activated protein kinase activity and glucose uptake in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 280, n. 5, p. E677-84, May 2001.

NAKAE, J.; ACCILI, D. The mechanism of insulin action. *J Pediatr Endocrinol Metab* [S.I.], v. 12 Suppl 3, p. 721-31, 1999.

NARKAR, V. *et al.* AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* [S.I.], v. 134, n. 3, p. 405-15, Aug 2008.

NESHER, R. *et al.* Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 249, n. 3 Pt 1, p. C226-32, Sep 1985.

O'BRIEN, D. The effect of prolonged physical training and high fat diet on heart size and body weight in rats. *Can J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 59, n. 3, p. 268-72, Mar 1981.

O'NEILL, D. *et al.* Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 276, n. 2 Pt 2, p. R414-9, Feb 1999.

PARK, H. *et al.* Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 36, p. 32571-7, Sep 2002.

PASCOE, W. S. *et al.* Differential targeting of facilitative glucose transporters in polarized epithelial cells. *Am J Physiol* [S.I.], v. 271, n. 2 Pt 1, p. C547-54, Aug 1996.

PATTI, M. E.; KAHN, C. R. The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 9, n. 2-4, p. 89-109, 1998.

PESSIN, J. E.; SALTIEL, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* [S.I.], v. 106, n. 2, p. 165-9, Jul 2000.

PETTE, D.; STARON, R. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* [S.I.], v. 116, p. 1-76, 1990.

PIMENTA, A. A. S. *et al.* Effect of a single session of electrical stimulation on activity and expression of citrate synthase and antioxidant enzymes in rat soleus muscle. *Eur J Appl Physiol* [S.I.], v. 102, n. 1, p. 119-26, Dec 2007.

PLOUG, T. *et al.* Kinetics of glucose transport in rat skeletal muscle membrane vesicles: effects of insulin and contractions. *Am J Physiol* [S.I.], v. 262, n. 5 Pt 1, p. E700-11, May 1992.

_____. Kinetics of glucose transport in rat muscle: effects of insulin and contractions. *Am J Physiol* [S.I.], v. 253, n. 1 Pt 1, p. E12-20, Jul 1987.

_____. Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin

and muscle contractions. *J Cell Biol* [S.I.], v. 142, n. 6, p. 1429-46, Sep 21 1998.

REITER, A. K. *et al.* Repression of protein synthesis and mTOR signaling in rat liver mediated by the AMPK activator aminoimidazole carboxamide ribonucleoside. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 288, n. 5, p. E980-8, May 2005.

REYNOLDS, T. H. *et al.* Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J Biol Chem* [S.I.], v. 277, n. 20, p. 17657-62, May 2002.

_____. Effects of exercise training on glucose transport and cell surface GLUT-4 in isolated rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* [S.I.], v. 272, n. 2 Pt 1, p. E320-5, Feb 1997.

_____. Effects of aerobic exercise training on the protein kinase B (PKB)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in aged skeletal muscle. *Exp Gerontol* [S.I.], v. 39, n. 3, p. 379-85, Mar 2004.

RIBON, V. *et al.* A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions. *J Biol Chem* [S.I.], v. 273, n. 7, p. 4073-80, Feb 13 1998.

RIBON, V.; SALTIEL, A. R. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* [S.I.], v. 324 (Pt 3), p. 839-45, Jun 15 1997.

RICHTER, E. *et al.* Regulation of muscle glucose transport during exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* [S.I.], v. 11 Suppl, p. S71-7, Dec 2001.

RICHTER, E. A. *et al.* Regulation of muscle glucose transport during exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* [S.I.], v. 11 Suppl, p. S71-7, Dec 2001.

ROACH, P. J. *et al.* Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 9, n. 2-4, p. 139-51, 1998.

ROSA NETO, J. *et al.* Exhaustive exercise causes an anti-inflammatory effect in skeletal muscle and a pro-inflammatory effect in adipose tissue in rats. *Eur J Appl Physiol* [S.I.], v. 106, n. 5, p. 697-704, Jul 2009.

ROSE, A. J.; RICHTER, E. A. Skeletal muscle glucose uptake during exercise: how is it regulated? *Physiology (Bethesda)* [S.I.], v. 20, p. 260-70, Aug 2005.

SAAD, M. J. *et al.* Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest* [S.I.], v. 90, n. 5, p. 1839-49, Nov 1992.

_____. Modulation of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, and phosphatidylinositol 3-kinase in liver and muscle of dexamethasone-treated rats. *J Clin Invest* [S.I.], v. 92, n. 4, p. 2065-72, Oct 1993.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* [S.I.], v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec 2001.

SHAMJI, A. F. *et al.* Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol Cell* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 271-80, Aug 2003.

SHEARER, J.; GRAHAM, T. E. Novel aspects of skeletal muscle glycogen and its regulation during rest and exercise. *Exerc Sport Sci Rev* [S.I.], v. 32, n. 3, p. 120-6, Jul 2004.

SHEPHERD, P. R. *et al.* Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* [S.I.], v. 305 (Pt 1), p. 25-8, Jan 1 1995.

SIU, P. M. *et al.* Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 94, n. 2, p. 555-60, Feb 2003.

SPINA, R. *et al.* Mitochondrial enzymes increase in muscle in response to 7-10 days of cycle exercise. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 80, n. 6, p. 2250-4, Jun 1996.

STARON, R.; HIKIDA, R. Histochemical, biochemical, and ultrastructural analyses of single human muscle fibers, with special reference to the C-fiber population. *J Histochem Cytochem* [S.I.], v. 40, n. 4, p. 563-8, Apr 1992.

STARON, R. S. *et al.* Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 76, n. 3, p. 1247-55, Mar 1994.

STERNLICHT, E. *et al.* Exercise and insulin stimulate skeletal muscle glucose transport through different mechanisms. *Am J Physiol* [S.I.], v. 256, n. 2 Pt 1, p. E227-30, Feb 1989.

_____. Exercise and insulin stimulate skeletal muscle glucose transport through different mechanisms. *Am J Physiol* [S.I.], v. 256, n. 2 Pt 1, p. E227-30, Feb 1989.

STOPPANI, J. *et al.* AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [S.I.], v. 283, n. 6, p. E1239-48, Dec 2002.

TOWBIN, H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979.

WASSERMAN, D. *et al.* Exercise-induced rise in glucagon and ketogenesis during prolonged muscular work. *Diabetes* [S.I.], v. 38, n. 6, p. 799-807, Jun 1989.

_____. Glucagon is a primary controller of hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during muscular work. *Am J Physiol* [S.I.], v. 257, n. 1 Pt 1, p. E108-17, Jul 1989.

_____. Importance of intrahepatic mechanisms to gluconeogenesis from alanine during exercise and recovery. *Am J Physiol* [S.I.], v. 254, n. 4 Pt 1, p. E518-25, Apr 1988.

WHITE, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol Cell Biochem* [S.I.], v. 182, n. 1-2, p. 3-11, May 1998.

WINDER, W. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 91, n. 3, p. 1017-28, Sep 2001.

WINDER, W.; THOMSON, D. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. *Cell Biochem Biophys* [S.I.], v. 47, n. 3, p. 332-47, 2007.

WINDER, W. W. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase increases mitochondrial enzymes in skeletal muscle. *J Appl Physiol* [S.I.], v. 88, n. 6, p. 2219-26, Jun 2000.

_____. Role of AMP-activated protein kinase in the molecular adaptation to endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* [S.I.], v. 38, n. 11, p. 1945-9, Nov 2006.

WISLØFF, U. *et al.* Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* [S.I.], v. 280, n. 3, p. H1301-10, Mar 2001.

WOJTASZEWSKI, J. *et al.* Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes* [S.I.], v. 51, n. 2, p. 284-92, Feb 2002.

WOJTASZEWSKI, J. F. *et al.* Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol* [S.I.], v. 528 Pt 1, p. 221-6, Oct 2000.

WRIGHT, D. *et al.* Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* [S.I.], v. 282, n. 1, p. 194-9, Jan 2007.

WRIGHT, D. C. *et al.* Ca^{2+} and AMPK both mediate stimulation of glucose transport by muscle contractions. *Diabetes* [S.I.], v. 53, n. 2, p. 330-5, Feb 2004.

YOSHIMURA, A. *et al.* Glycogen depletion in intrafusal fibres in rats during short-duration high-intensity treadmill running. *Acta Physiologica Scandinavica* [S.I.], v. 185, n. 1, p. 41-50, 2005.

ZINKER, B. A. *et al.* Regulation of glucose uptake and metabolism by working muscle. An in vivo analysis. *Diabetes* [S.I.], v. 42, n. 7, p. 956-65, Jul 1993.

ZISMAN, A. *et al.* Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med* [S.I.], v. 6, n. 8, p. 924-8, Aug 2000.

ABSTRACT

During dynamic exercise, the adenosine triphosphate (ATP) demand increases significantly and its replacement occurs through the glycogen and fatty acids catabolism. The effects of exercise on intramuscular glycogen stores have been widely investigated. However, there is no information about ultra endurance exercise effects on muscle metabolism. In last decades 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) protein has been described as a sensor of changes in energy sources, being directly affected by muscle contraction. The aim of this study was to evaluate the effects of ultra endurance exercise on muscle glycogen (GM) stores and the expression of AMPK protein. Methods: twenty four male Wistar rats, were randomly divided into four groups (sedentary S= 6, sedentary exhaustion SE = 6, trained T=6, and trained exhaustion TE = 6), where T and TE groups run progressively on a treadmill 5d/wk for 12 weeks (60% V_{max}). At the end of training period SE and TE were submitted to an ultra-endurance exercise (60% V_{max}) until exhaustion. The gastrocnemius of both legs were excised for glycogen analysis by colorimetric and by optical density method. Gene and protein AMPK expression was determined by real time RT-PCR and western blotting respectively. Results: SE and TE groups showed significant depletion of the GM storages ($S = 0.213 \pm 0.003$, $T = 0.203 \pm 0.007$, $SE = 0.031 \pm 0.006$, $TE = 0.028 \pm 0.006$ mg / g protein) ($p < 0.001$). The liver glycogen was significantly lower in TE when compared to T group ($p < 0.05$) ($S = 1.157 \pm 0.09$, $SE = 1.002 \pm 0.05$, $T = 1.533 \pm 0.05$ and $TE = 1.037 \pm 0.05$). A significant decrease in plasma glucose was observed in TE group ($p < 0.05$) ($S = 90.43 \pm 2.47$, $SE = 85.75 \pm 3.18$, $T = 84.84 \pm 2.19$, and $TE = 76.02 \pm 5.60$). The AMPK protein expression increased in T and TE groups ($p < 0.05$). However, gene expression increased only in TE group ($p < 0.05$). Conclusion: The ultra-endurance exercise depletes the GM reserves predominantly in type I muscle fibers. The training alone affected positively the protein expression of AMPK. This change was more evident when considered the exhaustion factor.

Keywords: Glycogen, AMP, ultra endurance, and exhaustive exercise.